



Karlsruher Institut für Technologie

**Rolle der Helikase RTEL1 in DNA-Reparatur,
Rekombination sowie in der Telomerstabilität 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 Dipl. Biol. Julia Recker
Aus Aachen

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky
Referent: Prof. Dr. Holger Puchta
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper
Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2014



Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Holger Puchta, der mir eine Promotion an seinem Lehrstuhl ermöglichte. Für das interessante und anspruchsvolle Thema dieser Arbeit sowie für die zahlreichen Diskussionen und für sein großes Interesse an meiner Arbeit bin ich sehr dankbar.

Prof. Dr. Jörg Kämper danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Korreferent zu betreuen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Alexander Knoll, der mir während meiner Arbeit mit zahlreichen guten Ratschlägen stets zur Seite stand. Die vielen fachlichen Diskussionen, sein immer offenes Ohr und sein großartiges Motivationstalent waren sehr hilfreich.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Alexander Knoll und Dr. Manfred Focke für das fleißige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Renate Kirchenbauer danke ich für die engagierte und zuverlässige Hilfe im Labor, ohne die ich einen Großteil der Daten dieser Arbeit gar nicht hätte produzieren können. An dieser Stelle bedanke ich mich außerdem bei Julia Kremer für ihre wertvolle Unterstützung bei den Southern Blots in der Endphase dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Botanischen Gartens, insbesondere Frau Wehrle, Herrn Knoch und Herrn Malakovski, für die gute und zuverlässige Pflege meiner Pflanzen.

Für das angenehme und entspannte Arbeitsklima danke ich allen Mitarbeitern des Instituts. Neben der technischen Hilfe und den fachlichen Ratschlägen bin ich dankbar für die Freundschaften, die in den letzten Jahren entstanden sind. An dieser Stelle danke ich besonders meinen ehemaligen und aktuellen Bürokolleginnen Dr. Susan Schröpfer, Dr. Jacqueline Schramm, Dr. Simone Bonnet, Dr. Laura Köhler und Dipl. Biol. Jeannette Steinert für die schöne Zeit.

Unendlich dankbar bin ich für die Freundschaft mit Dipl. Biol. Sabrina Kobbe. Ich danke ihr, dass sie seit Beginn des Studiums mit mir sowohl fachlich als auch privat durch sämtliche Höhen und Tiefen ging und dass sie immer für mich da ist.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern. Ohne ihre Unterstützung hätte ich die eine oder andere Hürde bis hier hin sicher nicht gemeistert. Vor allem meinem Vater danke ich für seine Unterstützung in den letzten Jahren und dafür, dass er immer an mich geglaubt hat.

Meiner Mutter danke ich, dass sie immer ein Auge auf mich hat und für den Sonnenschein an einem grauen Tag.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis, ihre guten Ratschläge und die Aufmunterung, wenn es einmal nicht so rund lief.

Für die Tatsache, dass Christopher so ziemlich seit Beginn dieser Arbeit für mich da ist, bin ich ebenfalls sehr dankbar. Trotz der nervigen Entfernung konnte ich immer auf ihn zählen. Ich danke ihm für sein außerordentliches Verständnis, seine Geduld und sein Talent mich immer wieder zum Lachen zu bringen.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis	V
III.	Tabellenverzeichnis.....	VII
IV.	Abkürzungsverzeichnis	IX
1	Einleitung.....	1
1.1	Telomere und Telomerase.....	2
1.1.1	Telomer-Binde Proteine.....	2
1.1.2	Telomerase	3
1.1.3	Alternative lengthening of telomeres (ALT)	4
1.2	DNA-Schäden und ihre Reparatur	4
1.3	Doppelstrangbruchreparatur	7
1.3.1	Nicht-homologe Endverknüpfung.....	7
1.3.2	Single-strand annealing.....	8
1.3.3	Homologe Rekombination	9
	Synthesis-dependent strand-annealing.....	9
	Double strand break repair.....	11
	Dissolution.....	11
1.3.4	Nicht-homologe und homologe Rekombination an den Telomeren.....	12
	NHEJ	12
	HR.....	13
1.4	DNA-Helikasen	14
1.4.1	<i>A/</i> RECQ4A	14
1.4.2	FANCM.....	16
1.4.3	SRS2.....	18
1.4.4	RTEL1	20
1.5	Ziele der Arbeit	22
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Material	24

2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Software und Datenbanken	26
2.1.3	Chemikalien	26
2.1.4	Medien, Lösungen, Puffer	27
2.1.5	Genotoxine und Antibiotika	30
2.1.6	Enzyme.....	31
2.1.7	Kits	31
2.1.8	Oligonukleotide.....	32
2.1.9	Organismen.....	32
2.1.10	Plasmide.....	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.1.1	<i>Isolierung von Nucleinsäuren</i>	34
2.2.1.2	<i>cDNA-Synthese</i>	35
2.2.1.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	35
2.2.1.4	<i>In-Fusion-Klonierung</i>	37
2.2.1.5	<i>Sequenzierung von DNA</i>	37
2.2.1.6	<i>Aufreinigung von DNA</i>	37
2.2.1.7	<i>Southern Blot</i>	38
2.2.2	Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	39
2.2.2.1	<i>Transformation des E. coli Stamms NEBa</i>	39
2.2.2.2	<i>Transformation des A. tumefaciens Stamms GV3101::pMP90</i>	39
2.2.2.3	<i>Identifikation und Analyse transformierter Klone</i>	40
2.2.3	Pflanzenarbeiten.....	40
2.2.3.1	<i>Pflanzenanzucht</i>	40
2.2.3.2	<i>Kreuzungen</i>	40
2.2.3.3	<i>Pollenvitalitätstest</i>	41
2.2.3.4	<i>Oberflächensterilisation von Arabidopsis-Samen</i>	41
2.2.3.5	<i>Sensitivitätstests</i>	41
2.2.3.6	<i>Rekombinationstests</i>	42
2.2.3.7	<i>Messung der Wurzellänge</i>	43
2.2.3.8	<i>Zelltod-Analyse in Wurzeln</i>	43
2.2.3.9	<i>Agrobakterien-vermittelte Transformation von Arabidopsis thaliana</i>	44
3	Ergebnisse.....	45

3.1	Die DNA-Helikase RTEL1 in <i>A. thaliana</i>.....	45
3.1.1	Charakterisierung einer T-DNA Insertionsmutante von <i>AtRTEL1</i>	45
3.1.2	Die Eisen-Schwefel-Domäne in RTEL1	46
3.1.3	Expressionsanalysen	47
3.1.4	Klonierung von Konstrukten zur Komplementation der <i>rtel1-1</i> Mutante.....	48
3.1.5	Die Funktion von <i>AtRTEL1</i> in der somatischen homologen Rekombination.....	49
3.1.6	Rolle von <i>AtRTEL1</i> in der Reparatur von DNA-Schäden	53
3.1.7	Einfluss von <i>AtRTEL1</i> und <i>AtMUS81</i> auf die Fertilität.....	57
3.1.8	Die Doppelmutante <i>rtel1-1 recq4A-4</i>	60
3.1.9	Die Rolle von <i>AtRTEL1</i> im Wurzelmeristem.....	62
	<i>rtel1-1</i>	64
	<i>rtel1-1 recq4A-4</i>	66
	<i>rtel1-1 fancm1-1</i>	68
	<i>rtel1-1 mus81-1</i>	69
3.1.10	Die Funktion von <i>AtRTEL1</i> in der Telomerstabilität	71
4	Diskussion.....	78
4.1	Die DNA-Helikase RTEL1 in <i>A. thaliana</i>.....	78
4.1.1	Die Eisen-Schwefel-Domäne in RTEL1	79
4.1.2	Expressionsanalysen in <i>rtel1-1</i>	79
4.1.3	Die Rolle von <i>AtRTEL1</i> in der somatischen homologen Rekombination	80
	<i>AtRTEL1</i> und <i>AtSRS2</i> in der somatischen HR.....	81
	<i>AtRTEL1</i> und <i>AtFANCM</i> in der somatischen HR	81
	<i>AtRTEL1</i> und <i>AtRECQ4A</i> in der somatischen HR.....	82
4.1.4	Die Rolle von <i>AtRTEL1</i> in der DNA-Reparatur	83
4.1.4.1	<i>AtRTEL1</i> in der interstrand-crosslink-Reparatur	83
4.1.4.2	<i>AtRTEL1</i> in der intrastrand-crosslink Reparatur.....	84
	<i>rtel1-1 fancm-1</i>	85
	<i>rtel1-1 mus81-1</i>	85
4.1.5	Rolle von <i>AtRTEL1</i> im Wurzelmeristem	86
	<i>rtel1-1 fancm-1</i>	88
	<i>rtel1-1 mus81-1</i>	89
	<i>rtel1-1 recq4A-4</i>	90
4.1.6	Einfluss von <i>AtRTEL1</i> und <i>AtMUS81</i> auf die Fertilität.....	92
4.1.7	Die Funktion von <i>AtRTEL1</i> in der Telomerstabilität	94

5	Zusammenfassung	98
6	Summary.....	100
7	Literaturverzeichnis.....	102
8	Anhang	112

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Umgehung von Schäden an Replikationsgabeln	7
Abbildung 1.2: Reparatur durch homologe Rekombination.....	10
Abbildung 1.3: Modell des <i>breakage-fusion-bridge cycles</i>	13
Abbildung 1.4: Modell zur Wirkung der Antirekombinase ScSRS2.	19
Abbildung 1.5: Modell zur Wirkung von RTEL1 an den Telomeren in Mäusen.....	21
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung von pSBO-2.....	33
Abbildung 2.2: Prinzip der PCR-basierten Genotypisierung.....	36
Abbildung 2.3: Rekombinationskonstrukt zur Untersuchung interchromosomaler HR.	43
Abbildung 3.1: Genstruktur von AtRTEL1 und die Position der T-DNA Insertion.....	46
Abbildung 3.2: Sequenzabgleich von <i>AtRTEL1</i> mit Helikasen mit bekannter Eisen-Schwefel-Domäne.....	47
Abbildung 3.3: Expressionsniveau von <i>AtRTEL1</i> in der Mutantenlinie <i>rtel1-1</i>	48
Abbildung 3.4: T-DNA Bereich des RTEL1-Komplementationsplasmid.	49
Abbildung 3.5: Rekombinationsrate von <i>rtel1-1</i>	50
Abbildung 3.6: Rekombinationsrate von <i>rtel1-1</i> und <i>fancm-1</i>	51
Abbildung 3.7: Rekombinationsrate von <i>rtel1-1</i> und <i>fancm-1</i> nach Genotoxin-Behandlung.	52
Abbildung 3.8: Sensitivität von <i>rtel1-1</i> gegenüber MMC.	53
Abbildung 3.9: Sensitivität der Doppelmutante <i>rtel1-1 fancm-1</i> gegenüber MMC.....	54
Abbildung 3.10: Sensitivität von <i>rtel1-1</i> gegenüber <i>cis</i> -Platin.	55
Abbildung 3.11: Sensitivität von <i>rtel1-1 fancm-1</i> gegenüber <i>cis</i> -Platin..	56
Abbildung 3.12: Sensitivität von <i>rtel1-1 mus81-1</i> gegenüber MMC und <i>cis</i> -Platin.....	57
Abbildung 3.13: Anzahl der Samen pro Schote.....	58
Abbildung 3.14: Pollenvitalität in <i>rtel1-1 mus81-1</i>	59
Abbildung 3.15: Rückkreuzung von <i>rtel1-1 mus81-1</i> mit dem Wildtyp.....	60
Abbildung 3.16: Wuchsdefekte von <i>rtel1-1 recq4A-4</i>	61
Abbildung 3.17: Wurzellänge nach einer Woche Anzucht..	63
Abbildung 3.18: Zelltod im Wurzelmeristem von <i>rtel1-1 recq4A-4</i>	65
Abbildung 3.19: Zelltod in <i>rtel1-1 recq4A-4</i> nach <i>cis</i> -Platin-Behandlung.	67
Abbildung 3.20: Zelltod im Wurzelmeristem.....	69
Abbildung 3.21: Zelltod im Wurzelmeristem im Grundzustand.	70
Abbildung 3.22: Zelltod im Wurzelmeristem nach <i>cis</i> -Platin-Behandlung.	72
Abbildung 3.23: Entwicklung von <i>rtel1-1 tert</i>	73

Abbildung 3.24: Wurzellänge in *rtel1-1 tert*.....74

Abbildung 3.25: Zelltod im Wurzelmeristem von *rtel1-1 tert* (F5-Generation)..75

Abbildung 3.26: Zelltod im Wurzelmeristem von *rtel1-1 tert*.76

Abbildung 3.27: TRF-Analyse in *rtel1-1*.77

Abbildung 4.1: Modell zur Beteiligung von RTEL1 in der *interstrand-crosslink*-Reparatur in
A. thaliana.84

Abbildung 4.2: Modell zur Beteiligung von RTEL1 in der *intrastrand-crosslink*-Reparatur in
A. thaliana.92

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Antibiotika. C_{Stock} : Stockkonzentration.	31
Tabelle 2.2: Liste der verwendeten T-DNA insertionsmutanten.	33
Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Konzentrationen der verschiedenen Genotoxine.	42
Tabelle 8.1: Relative Expression von <i>AtRTEL1</i> in <i>rtel1-1</i>	112
Tabelle 8.2: Rekombinationsrate von <i>rtel1-1</i> , den Komplementationslinien, <i>srs2-2</i> , <i>rtel1-1 srs2-2</i> und des Wildtyps.	112
Tabelle 8.3: Rekombinationsrate von <i>rtel1-1</i> , <i>fanm-1</i> , <i>rtel1-1 fanm-1</i> und des Wildtyps.	113
Tabelle 8.4: Relatives Frischgewicht [%] von <i>rtel1-1</i> , <i>fanm-1</i> , <i>rtel1-1 fanm-1</i> und des Wildtyps nach MMC-Behandlung (5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$).	114
Tabelle 8.5: Relatives Frischgewicht [%] von <i>rtel1-1</i> , <i>mus81-1</i> , <i>rtel1-1 mus81-1</i> und des Wildtyps nach MMC-Behandlung (5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$).	114
Tabelle 8.6: Relatives Frischgewicht [%] von <i>rtel1-1</i> , der Komplementationslinien JR448-450 und des Wildtyps nach <i>cis</i> -Platin-Behandlung (5: 7,5; 8,5; 10 μM).	115
Tabelle 8.7: Relatives Frischgewicht [%] von <i>rtel1-1</i> , <i>fanm-1</i> , <i>rtel1-1 fanm-1</i> , <i>mus81-1</i> , <i>rtel1-1 mus81-1</i> und des Wildtyps nach <i>cis</i> -Platin-Behandlung (5: 7,5; 8,5; 10 μM).	116
Tabelle 8.8: Durchschnittliche Anzahl der Samen pro Schote bei <i>rtel1-1</i> , <i>mus81-1</i> , <i>rtel1-1 mus81-1</i> , dem Wildtyp und den Komplementationslinien JR448-449.	117
Tabelle 8.9: Rückkreuzung von <i>rtel1-1 mus81-1</i> mit dem Wildtyp.	117
Tabelle 8.10: Flächeninhalt [mm^2] der Antheren von <i>rtel1-1</i> , <i>mus81-1</i> , <i>rtel1-1 mus81-1</i> und des Wildtyps.	118
Tabelle 8.11: Wurzellänge [cm] nach einer Woche Anzucht.	119
Tabelle 8.12: Wurzellänge der Komplementationslinien sowie der F4- und F5-Generation von <i>rtel1-1</i> , <i>tert</i> , <i>rtel1-1 tert</i> und des Wildtyps.	120
Tabelle 8.13: Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem im Grundzustand.	121
Tabelle 8.14: Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem nach <i>cis</i> - Platin-Induktion.	122
Tabelle 8.15: Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem im Grundzustand.	123
Tabelle 8.16: Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem nach <i>cis</i> - Platin-Induktion.	124

Tabelle 8.17: : Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem im Grundzustand in der F4- und F5-Generation von *rtel1-1*, *tert*, *rtel1-1 tert* und des Wildtyps.....125

Tabelle 8.18: Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem nach *cis*-Platin-Induktion in der F4- und F5-Generation von *rtel1-1*, *tert*, *rtel1-1 tert* und des Wildtyps.....126

Tabelle 8.19: Primer zur Genotypisierung.....127

Tabelle 8.20: Liste der verwendeten Primer für Klonierungen und Expressionsanalysen.....127

IV. Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alternative lengthening of telomeres
AP-Stelle	Apurinische/apyrimidinische Stelle
At, <i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BS	Bloom Syndrom
cDNA	complementary DNA
Ce, <i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cis-Pt	<i>cis</i> -Diamin-dichloro-platin (II)
CL	crosslink
CO	Crossover
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia
C-terminal	Carboxyterminal
DDR	DNA damage response
dHJ	doppelte Holliday Junction
D-Loop	displacement loop
DNA	Desoxy ribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	double strand break repair
dsDNA	double stranded DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
gDNA	genomische DNA
GM	Germinationsmedium
HJ	Holliday Junction
HR	homologe Rekombination
Hs	<i>Homo sapiens</i>
HU	Hydroxyurea
ICL	interstrand-crosslink

kb	Kilobasenpaare
LB	1. left border; 2. lysogeny broth medium
MCS	multiple cloning site
MMC	Mitomycin C
MMEJ	Microhomology-mediated end joining
MMR	Mismatch-Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
NCO	Noncrossover
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	nicht-homologe Endverknüpfung, non-homologous endjoining
N-terminal	Aminoterminal
NTP	Nukleotidtriphosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction
ppm	parts per million
PPT	Phosphinothricin
PRR	Postreplikative Reparatur
QC	Quiescent center, Ruhezentrum
RB	right border
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, reactive oxygen species
RTS	Rothmund-Thomson-Syndrom
Sc, <i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCE	Schwesterchromatidaustausch, sister chromatid exchange
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDSA	synthesis-dependent strand annealing
SF1	Superfamilie 1 der Helikasen
SF2	Superfamilie 2 der Helikasen
SF3	Superfamilie 3 der Helikasen
SSA	single strand annealing
ssDNA	single stranded DNA
SZ	Stammzelle
SZN	Stammzellnische
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
T-DNA	Transfer-DNA
Ti	Tumor-induzierend
TLS	Translasionssynthese

TRF	terminal restriction fragments
U	Unit
UV	Ultraviolett
WBS	Warsaw Breakage Syndrom
WRN	Werner Syndrom RecQ Helikase
WS	Werner Syndrom
WT	Wildtyp
X-GlcA	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid)cyclohexyl-Ammoniumsalz

1 Einleitung

In einer Ära, in der weitgehend Proteine als Träger genetischer Informationen galten, postulierten Avery *et al.* vor genau siebzig Jahren die Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Ursache bakterieller Transformation (Avery *et al.*, 1944). Es war bereits bekannt, dass die Erbinformation eines Bakterienstamms mittels Transformation auf einen anderen Bakterienstamm übertragen werden konnte. Allerdings war unklar, welche Substanz im Detail dafür verantwortlich war. Mit dem Avery-MacLeod-McCarty-Experiment konnten sie die DNA als Grundlage der Vererbung identifizieren, denn nur diese ermöglichte einen Bakterienstamm zu transformieren (Avery *et al.*, 1944).

In allen Lebewesen ist die DNA als Träger der Erbinformation essentiell. Sie ermöglicht der Zelle Informationen aller Lebensprozesse zu speichern und diese an Folgegenerationen weiterzugeben. Aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung ist die DNA jedoch reaktiv und weist nur eine limitierte chemische Stabilität auf. Dadurch kann es zu DNA-Schäden sowie Mutationen und somit zur Änderungen des Erbguts kommen. Diese Mutationen können sich einerseits positiv auf die Evolution und Artenvielfalt auswirken. Andererseits können sie eine negative Wirkung auf die Genomstabilität haben. Eine effiziente DNA-Schadensreparatur ist für die Zelle also von besonderer Wichtigkeit. Bei der Reparatur wird die Zelle jedoch vor ein Problem gestellt: Aufgrund der linearen Anordnung eukaryotischer Chromosomen kann die Zelle nicht zwischen Chromosomenenden und schädigenden Doppelstrangbrüchen (DSBs) unterscheiden (*end protection problem*). Eine unangemessene Reparatur dieser Enden kann zu fehlerhaften Chromosomenfusionen führen und dadurch negativen Einfluss auf die Genomstabilität haben. Aus diesem Grund befinden sich an den Enden der Chromosomen sogenannte Telomere, welche mit speziellen Telomer-Binde-Proteinen interagieren und so die Chromosomen schützen und der Zelle die Unterscheidung zwischen DNA-Schaden und Chromosomenende ermöglichen. Zudem

ist die Zelle nicht in der Lage, die Chromosomenenden vollständig zu replizieren (*end replication problem*). Hier übernehmen die Telomere ebenfalls eine schützende und stabilisierende Funktion.

Das Zusammenspiel der Proteine zur Behebung von DNA-Schäden und zur Gewährleistung der Telomerhomöostase ist sehr komplex. Die Beteiligung verschiedener Proteinklassen, wie beispielsweise Nukleasen, Polymerasen, Ligasen, Topoisomerasen und Helikasen ist für die Regulation und den korrekten Ablauf wichtig. So sind beispielsweise Proteine der DNA-Schadensantwort (*DNA-damage response*, DDR) ebenfalls für die Regulierung des Telomererhalts von Bedeutung.

In dieser Arbeit werden hauptsächlich die Funktionen der DNA-Helikase RTEL1 während der homologen Rekombination, der DNA-Reparatur sowie in der Telomerhomöostase in *Arabidopsis thaliana* untersucht.

1.1 Telomere und Telomerase

Telomere bestehen aus Guanin- und Thymin-reichen Sequenzwiederholungen, die durch einen Proteinkomplex gebunden werden. Die Länge der Telomere kann von Organismus zu Organismus stark variieren. Während die Länge in Hefe ungefähr 300 bp beträgt, können sie in Pflanzen und Säugern eine Länge von mehreren Kilobasen erreichen (Übersicht in Sfeir, 2012). Das Ende der Telomere bildet in der Regel ein 3'-Einzelstrang.

1.1.1 Telomer-Binde Proteine

In Vertebraten werden die Telomere vom sogenannten Shelterin-Komplex gebunden. Dieser Komplex, bestehend aus den sechs Proteinen TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 und POT1, ermöglicht die 3'-Einzelstrang-Invasion in nahegelegene DNA-Doppelstrangbereiche. Diese spezielle D-Loop-Struktur wird T-Loop genannt und schützt das Chromosomenende (de Lange, 2005). Während TRF1 und TRF2 dsDNA binden, interagiert POT1 mit dem ssDNA-Überhang. Anschließend rekrutieren TRF2 und POT1 ihre Interaktionspartner RAP1 beziehungsweise TPP1. Das Protein TIN2 stellt die Verbindung zwischen dem einzelsträngigen und dem doppelsträngigen Bereich dar, indem es sowohl mit TPP1 als auch mit TRF1 und TRF2 interagiert. Die Proteine verhindern eine unangemessene Rekombination an den Chromosomenenden sowie eine Telomerverknüpfung der verschiedenen Chromosomen. Zudem sind sie wichtig für eine korrekte Replikation an den Telomeren und regulieren außerdem die Länge der Telomere (Palm und de Lange, 2008; Martinez und Blasco, 2011).

In Hefe besteht der Proteinkomplex zum Schutz der Telomere aus CDC13, STN1 und TEN1 und wird als CST-Komplex zusammengefasst (Grandin *et al.*, 2001). In Vertebraten dient der CST-Komplex als zusätzlicher Schutz und wird vom Shelterin-Komplex rekrutiert (Miyake *et al.*, 2009).

In Pflanzen wurden nur einige der Shelterin-Komponenten identifiziert (Übersicht in Amiard *et al.*, 2011). Allerdings ist der CST-Komplex ebenfalls konserviert (Song *et al.*, 2008; Surovtseva *et al.*, 2009).

Ein Verlust der Telomer-Binde Proteine führt in allen Lebewesen zur Aktivierung der DDR. Seneszenz und Zelltod sind die Folgen. Um die Telomerhomöostase zu gewährleisten, sind die Regulation und das Zusammenspiel der Proteine an den Telomeren enorm wichtig.

In Säugern wird die DDR von den drei Proteinkinasen ATM, ATR und DNA-PKcs reguliert. Nach Aktivierung der Proteinkinasen sind diese in der Lage eine Vielzahl von Zielproteinen zu phosphorylieren, die eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Genomintegrität spielen und die Eliminierung defekter Zellen mittels p53 zulassen können (Matsuoka *et al.*, 2007; Rozan und El-Deiry, 2007). Während ATM und ATR in Pflanzen konserviert sind, konnte ein Homolog von DNA-PKcs nicht identifiziert werden (Garcia *et al.*, 2003; Culligan *et al.*, 2004; Templeton und Moorhead, 2005). Es wird angenommen, dass in Pflanzen der Transkriptionsfaktor SOG1 die Rolle von p53 übernimmt (Yoshiyama *et al.*, 2009).

1.1.2 Telomerase

Wie bereits erwähnt, gibt es neben einer möglichen falschen DDR ein weiteres Problem an den Telomeren: Da die DNA-Polymerase während der Replikation einen Primer benötigt und daher nicht in der Lage ist das letzte Stück vom Telomer zu replizieren, werden mit jeder Replikation die Telomere kürzer. Hat die Telomerlänge ein kritisches Minimum erreicht, sind Seneszenz und Apoptose die Folge.

Durch das Protein Telomerase können solche Verkürzungen wieder ausgeglichen werden. Der Enzymkomplex besteht aus einer Reversen Transkriptase (TERT) und einem RNA-Teil (TR). Mittels reverser Transkription werden die Telomere wieder verlängert; dabei dient der RNA-Teil als Matrize. Die Telomeraseaktivität ist in den meisten somatischen Zellen nicht nachweisbar. Eine Aktivität findet man sowohl in sich kontinuierlich teilenden Zellen, Keimzellen, Stammzellen als auch in Krebszellen (Kim *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1996).

Der Verlust von TERT führt in Mäusen zu einer reduzierten Fertilität. Des Weiteren weisen die Mutanten nach der dritten Generation zunehmende Defekte in sich schnell teilenden Organen auf und sind in der sechsten Generationen schließlich steril (Rudolph *et al.*, 1999).

Auch in *A. thaliana* führt eine Mutation in *TERT* zu einer rapiden kontinuierlichen Verkürzung der Telomere. Wachstumsdefekte und undifferenzierte Wucherungen, die sich in jeder Folgegeneration verschlimmern, sind die Folge. Nach zehn bis elf Generationen kommt die Entwicklung zum Erliegen (Riha *et al.*, 2001). Zwar sind Pflanzen durch den Verlust von *TERT* auch stark in ihrer Entwicklung eingeschränkt, dennoch haben sie im Vergleich zu Mäusen eine längere Lebensdauer. Eine Erklärung könnten die Unterschiede in der Kontrolle der Genomintegrität und Apoptose zwischen Tieren und Pflanzen sein. Im Gegensatz zu Vertebraten ist der programmierte Zelltod in Pflanzen hauptsächlich auf sich teilende Meristeme begrenzt (Amiard *et al.*, 2014).

1.1.3 Alternative lengthening of telomeres (ALT)

Neben der Telomerase kann weiterhin ein alternativer Weg zur Aufrechterhaltung der Telomerlänge dienen. Dieser Weg wird als ALT bezeichnet und basiert auf homologer Rekombination (HR). Der Mechanismus ist in vielen immortalisierten Zellen und Tumorzellen präsent. ALT-Zellen haben lange heterogene Telomere und weisen zudem extrachromosomale Telomer-DNA sowie ALT-assoziierte *promyelocytic leukemia bodies* (APBs) auf (Bryan *et al.*, 1995; Bryan *et al.*, 1997). Zur Verlängerung der Telomere dienen beim ALT die Telomere anderer Chromatide oder die extrachromosomalen Telomer-Bereiche als Matrize (Dunham *et al.*, 2000). Es wird davon ausgegangen, dass ALT der ursprüngliche Weg zur Stabilisierung der Chromosomenenden war, als erstmals lineare Chromosomen in den Eukaryoten auftraten. Im Laufe der Evolution wurde dieser Mechanismus vom Telomerase-abhängigen Mechanismus unterdrückt (de Lange, 2004). Erst kürzlich wurde in normalen Mauszellen eine Aktivität von ALT nachgewiesen (Neumann *et al.*, 2013). In *A. thaliana* weisen *tert*-Mutanten nur einen geringen Telomer-Verlust auf, der nicht zu der durchschnittlichen Anzahl von Zellteilungen pro Generation passt. In Pflanzen ist ALT offenbar ebenfalls ein üblicher Mechanismus (Ruckova *et al.*, 2008).

1.2 DNA-Schäden und ihre Reparatur

Alle lebenden Organismen sind ständig DNA-schädigenden Einflüssen ausgesetzt. Diese DNA-Schäden können unterschiedliche Ursachen haben. Neben endogenen, genotoxischen Molekülen, wie beispielsweise freien Radikalen und alkylierenden Substanzen aus dem Stoffwechsel der Zelle, existieren eine Vielzahl exogener Faktoren. Von ihnen sind Pflanzen besonders betroffen, da sie aufgrund ihrer sessilen Lebensweise diesen Faktoren nicht ausweichen können (Walbot, 1985).

Exogene DNA-Schäden können sowohl abiotischer Herkunft sein, wie zum Beispiel UV-Strahlung oder ionisierende Strahlung aus dem Boden, als auch biotischer Herkunft, wie beispielsweise Genotoxine von Pilzen und Bakterien. Die dadurch hervorgerufenen Schäden in der DNA können sehr vielseitig sein. Neben fehlender oder modifizierter Basen mit veränderten Basenpaarungseigenschaften und kovalenten Verbindungen benachbarter Basen, können Quervernetzungen (Crosslinks) zwischen DNA-Strängen sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche (ESBs beziehungsweise DSBs) der DNA die Folge sein. Für die Zelle bedeuten diese Schäden eine Beeinträchtigung der Replikation und Transkription. Werden sie nicht repariert, kann dies zu Mutationen im Genom mit schweren Folgen für den Organismus führen. Sie können in unkontrollierter Zellproliferation, Beeinflussung natürlicher Alterungsprozesse, Verlust zellulärer Funktionen oder Zelltod resultieren. Da Pflanzen keine prädeterminierte Keimbahn besitzen, können somatische Veränderungen auch an Nachkommen der nächsten Generation weitergegeben werden (Ries *et al.*, 2000). Zur Gewährleistung der Genomstabilität, trotz DNA-Schäden, haben sich im Laufe der Evolution effiziente Reparaturmechanismen entwickelt, die die Schäden entweder rückgängig machen, ausschneiden oder tolerieren (de Laat *et al.*, 1999; Tuteja *et al.*, 2001).

Nukleotide, die während der Replikation oder homologen Rekombination falsch eingebaut wurden, können mittels Mismatch-Reparatur (MMR) entfernt werden. Nachdem der Mismatch durch MMR-Proteine erkannt wurde, werden weitere MMR-Faktoren rekrutiert. Durch eine Endonuklease wird die fehlerhafte Stelle letztendlich herausgeschnitten und der parentale DNA-Strang als Matrize für die Neusynthese verwendet. Die MMR-Faktoren sind in allen Organismen stark konserviert. Homologe der initialen MMR-Faktoren MutS und MutL konnten sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten nachgewiesen werden (Übersicht in Iyer *et al.*, 2006).

DNA-Schäden, die auf Veränderungen einzelner Basen zurückzuführen sind, können durch die Basen-Exzisionsreparatur (BER) behoben werden. Zu diesen Veränderungen zählen beispielsweise Alkylierung, Deaminierung oder Oxidation. Durch DNA-Glykosylasen wird die veränderte Base erkannt und entfernt. Die dadurch entstandene apurine beziehungsweise apyrimidine Stelle (AP-Stelle) wird daraufhin durch eine AP-Endonuklease geschnitten. Dieser Einzelstrangbruch wird entweder mittels *single-nucleotide* BER (SN-BER) oder *long-patch*-BER (LP-BER) repariert. Während bei der SN-BER in Säugern nur ein Nukleotid ersetzt wird, kommt es bei der LP-BER durch eine DNA-Polymerase zur Verdrängung und Neusynthese von 6 bis 13 Nukleotiden. Anschließend werden beide Reparaturwege durch eine Ligation beendet (Fortini und Dogliotti, 2007; Liu *et al.*, 2007).

Auf einem ähnlichen Prinzip beruht die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER). Im Gegensatz zur BER wird bei der NER jedoch ein größerer fehlerhafter Einzelstrangbereich aus der DNA herausgeschnitten und anschließend der fehlende DNA-Abschnitt neu synthetisiert. Durch die NER werden DNA-verzerrende Schäden, wie beispielsweise UV-induzierte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und unförmige Addukte an der DNA, erkannt und behoben (Gillet und Scharer, 2006). Aufgrund der unterschiedlichen Schadenserkenung lässt sich die NER in zwei Wege gliedern. Durch die *global genome* NER (GG-NER) werden Schäden transkriptionsunabhängig im gesamten Genom repariert. Die *transcription-coupled* NER (TC-NER) behebt DNA-Schäden, die zur Blockade der Transkription führen (Mu und Sancar, 1997). Die anschließende Prozessierung des Schadens verläuft in beiden Reparaturwegen gleich: Der beschädigte DNA-Bereich wird durch eine Helikase entwunden und eine Endonuklease entfernt den schadhaften Bereich. DNA-Polymerase und Ligasen schließen im Anschluss die entstandene Lücke (Britt, 2002).

Im Gegensatz zu Säugern haben Pflanzen, Pilze und Bakterien eine weitere Möglichkeit UV-induzierte CPDs zu reparieren. Sie besitzen das Enzym Photolyase. Diese Photolyasen binden an den DNA-Schaden und lösen die kovalente Verbindung zwischen den Basendimeren auf. Die nötige Energie bei diesem Photoreaktivierungsmechanismus wird durch Chromophore absorbiert. Durch die Übertragung der Anregungsenergie auf das reduziert vorliegende FADH kommt es zur Umordnung der Elektronen. Dadurch wird die kovalente Bindung zwischen den Basendimeren revertiert (Übersicht in Essen und Klar, 2006).

Werden DNA-Schäden bis zur S-Phase des Zellzykluses nicht behoben, kann dies zu einer Blockade der fortschreitenden Replikationsgabel führen, da replikative DNA-Polymerasen diese Schäden nicht überwinden können. Dieser Replikationsblock kann mit Hilfe der Transläsionssynthese (TLS) überbrückt werden. Hierbei können spezialisierte Transläsionspolymerasen über den Schaden hinweg synthetisieren. Abhängig von der Art des Schadens und der TLS-Polymerase kann es entweder zur fehlerfreien Strang-Synthese kommen oder zum Einbau nicht komplementärer Nukleotide (Prakash *et al.*, 2005b).

Ein weiterer Schadenstoleranzweg ist die postreplikative Reparatur (PRR). Hierbei wird der unbeschädigte Tochterstrang ein Stück über den Schaden hinaus repliziert. Dieser neusynthetisierte Tochterstrang kann nun als Matrize für die Replikation über den Schaden hinweg im beschädigten Tochterstrang dienen. Dieses sogenannte *template switching* kann zum einen durch die Invasion vom Einzelstrang in den homologen Bereich des Schwesterchromatids erfolgen, wobei es zur Ausbildung eines *displacement loops* (D-Loops) kommt (vgl. Abschnitt 1.3.3).

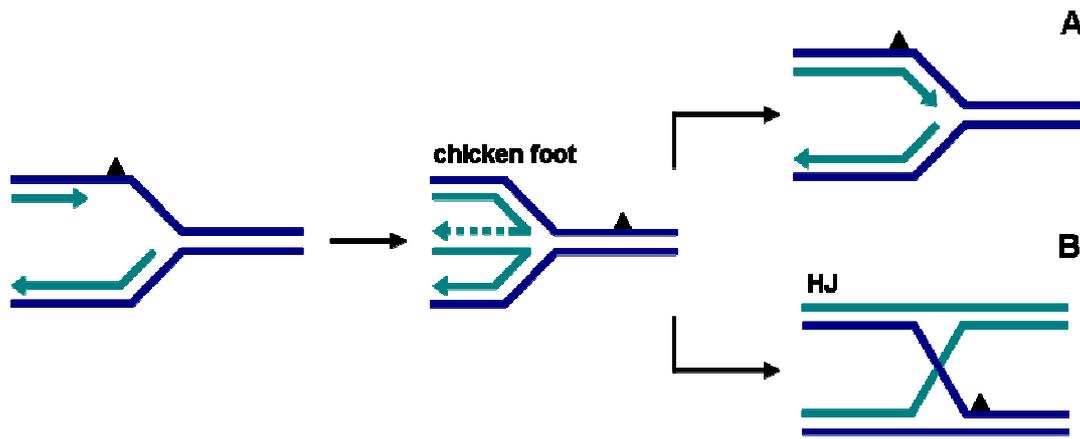


Abbildung 1.1: Umgehung von Schäden an Replikationsgabeln. Bei einer Läsion (schwarzes Dreieck) während der Replikation kann die Synthese nicht mehr fortgesetzt werden. Durch die weitergeführte Synthese des unbeschädigten Strangs und der Regression der Replikationsgabel kann der neu replizierte Tochterstrang als Matrize für die Replikation über den Schaden hinweg dienen. Eine *chicken-foot*-Struktur entsteht. Anschließend kann die ursprüngliche Replikation fortgeführt werden (A). Da die *chicken-foot*-Struktur topologisch einer HJ ähnelt, kann die Struktur alternativ mittels HR repariert werden (B)

Zum anderen kann es durch eine Regression der Replikationsgabel erfolgen. Es entsteht eine sogenannte *chicken foot*-Struktur, welche topologisch einer Holliday Junction (HJ) ähnelt. Nach Auflösung dieser Struktur durch erneute Umkehrung der Replikationsgabel kann die ursprüngliche Replikation fortgeführt werden. Alternativ wird der Schaden durch die HR repariert (Abbildung 1.1; Blastyak *et al.*, 2007; Unk *et al.*, 2010).

1.3 Doppelstrangbruchreparatur

Die Reparatur von DSBs ist kompliziert. Hier kann die Reparaturmaschinerie nicht auf den intakten, komplementären Strang zurückgreifen kann. Es gibt mehrere Reparaturwege zur Behebung der DSBs (Puchta, 2005; Bleuyard *et al.*, 2006), die sich in ihrer Reparaturgenauigkeit unterscheiden. Neben der schnellen aber fehlerhaften nicht-homologen Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ) kann ein DSB mittels HR durch die Verwendung homologer Bereiche fehlerfrei repariert werden. In den folgenden Abschnitten werden die verschiedenen Reparaturmechanismen zur Behebung von DSBs näher beschrieben.

1.3.1 Nicht-homologe Endverknüpfung

In komplexen Eukaryoten werden DSBs hauptsächlich durch die nicht-homologe Endverknüpfung repariert. Das NHEJ ist ein evolutionär hochkonservierter Mechanismus, der auf einer Ligation der freien Enden beruht. Durch die Anlagerung des Heterodimers

KU70/KU80 an die freien DNA-Enden des Bruchs wird die Degradation der DNA verhindert. In Säugern wird daraufhin die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) rekrutiert, diese bewirkt die Bindung weiterer NHEJ-Proteine an den DSB. Durch die Exonuklease ARTEMIS werden nicht ligierbare Enden prozessiert und durch das XRCC4/Ligase IV-Heterodimer verknüpft (Hefferin und Tomkinson, 2005). Anders als in Säugern rekrutiert das KU70/KU80-Heterodimer in Pflanzen den MRN-Komplex (MRE11/RAD50/NBS1) zur Bruchstelle (Bleuyard *et al.*, 2006). Durch die Endo- und Exonukleaseaktivität von MRE11 werden die Enden prozessiert und durch das XRCC4/LigaseIV-Homolog DNL4/LIF1-Heterodimer ligiert. Ein alternativer NHEJ-Weg nutzt Mikrohomologien an der Bruchstelle zur Reparatur der DSBs. Für dieses sogenannte *microhomology-mediated-end-joining* (MMEJ) ist eine Resektion der 5'-Enden zur Erstellung von freien 3'-Überhängen nötig (Lee und Lee, 2007). Die überstehenden nicht homologen Bereiche werden vor der Ligation entfernt (Ma *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2008).

Innerhalb der NHEJ/MMEJ-Reparaturwege kann es zu Deletionen oder Insertionen kommen, wodurch der Reparaturmechanismus einen direkten Einfluss auf die Genomevolution haben kann (Kirik *et al.*, 2000; Puchta, 2005).

1.3.2 Single-strand annealing

Ein weiterer Reparaturweg von DSBs ist das *single-strand annealing* (SSA), welches längere, direkte Sequenzwiederholungen in der Nähe der Bruchstelle zur Reparatur nutzt (Lin *et al.*, 1984). Dazu werden, ähnlich wie beim MMEJ-Mechanismus, 3'-Überhänge erzeugt. Beim SSA sind diese 3'-Überhänge jedoch deutlich länger und es sind andere Proteine am Reparaturweg beteiligt. In Hefe erfolgt die Resektion durch die Exonuklease 1 (*ScExo1*) oder durch die Endonuklease *ScDNA2* zusammen mit der RecQ Helikase *ScSGS1* (Bae *et al.*, 1998; Mimitou und Symington, 2008; Zhu *et al.*, 2008). Die 3'-Überhänge werden anschließend vom Einzelstrangbinde-Protein RPA (*replication protein A*) gebunden. RAD52 ermöglicht die Hybridisierung der homologen Abschnitte. Vor der Ligation des Rückgrats werden die nicht-homologen Bereiche der 3'-Überhänge durch Nukleasen entfernt. Dabei wird sowohl der Bereich zwischen den Sequenzwiederholungen als auch eine der beiden Sequenzwiederholungen deletiert. Für die Homologiesuche beim SSA wird kein RAD51 benötigt. Damit unterscheidet sich dieser Reparaturmechanismus von der homologen Rekombination, bei der diese Rekombinase eine entscheidende Rolle spielt (Abschnitt 1.3.3; Ivanov *et al.*, 1996; Lambert und Lopez, 2000).

1.3.3 Homologe Rekombination

Die HR ist ein essentieller Prozess, der in allen Zellen konserviert ist. In somatischen Zellen ist sie sowohl für die Reparatur von DSBs als auch für die Wiederaufnahme der Replikation an blockierten Replikationsgabeln wichtig. Anders als die NHEJ gewährleistet die HR eine fehlerfreie Reparatur des Schadens. Des Weiteren spielt die HR eine wesentliche Rolle in der Meiose. Hier ermöglicht sie die Neukombination genetischer Information von Elternchromosomen. Die HR lässt sich in folgende Schritte unterteilen: Resektion der DNA-Enden, Stranginvasion und homologe DNA-Paarung sowie DNA-Synthese und Prozessierung der DNA-Intermediate. Auf die einzelnen Schritte wird in den nächsten Abschnitten näher eingegangen.

Um den DSB zu reparieren, müssen zunächst einzelsträngige 3'-Überhänge gebildet werden. Diese 5'-3' Resektion erfolgt in Hefe und in Säugern durch den MRN-Komplex, bestehend aus MRE11, RAD50, NBS1 (in Hefe MRX mit XRS2), welcher die Resektion der 5'-Enden einleitet. Die Ausbildung der benötigten längeren 3'-Überhänge wird entweder von der 5'-3' Exonuklease EXO1 oder der ssDNA Endonuklease DNA2 katalysiert. Anders als für EXO1 ist für die Resektion durch DNA2 die DNA-Helikase BLM (SGS1 in Hefe) essentiell (Gravel *et al.*, 2008; Mimitou und Symington, 2008; Zhu *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BLM ebenfalls die Resektionsgeschwindigkeit von EXO1 erhöht (Nimonkar *et al.*, 2011). Die 3'-Überhänge dienen als DNA-Substrat für die Rekombinase RAD51, welche einzelsträngige DNA bindet, sodass ein langes RAD51/DNA-Filament entsteht. Dieses Filament invadiert doppelsträngige DNA, um diese mit homologen Sequenzen abzugleichen und Basenpaarungen mit einem der beiden Stränge einzugehen. Dabei wird der andere Strang verdrängt und es entsteht ein D-Loop. Mittels einer DNA-Polymerase und dem komplementären Donorstrang als Matrize kann das freie 3'-Ende des invadierten Einzelstrangs verlängert werden.

Das entstandene D-Loop-Rekombinationsintermediat kann anschließend auf verschiedene Weise prozessiert werden.

Synthesis-dependent strand-annealing

Beim *synthesis-dependent strand-annealing* (SDSA) wird der D-Loop nach Verlängerung des invadierten Einzelstrangs wieder aufgelöst. Dies ermöglicht eine Bindung des neusynthetisierten Strangs an das zweite freie Ende des DSB (Nassif *et al.*, 1994). Anschließend werden die Einzelstranglücken durch DNA-Polymerasen und Ligasen geschlossen. Dieser Reparaturmechanismus kann nur zu Non-Crossover (NCO) führen (Abbildung 1.2).

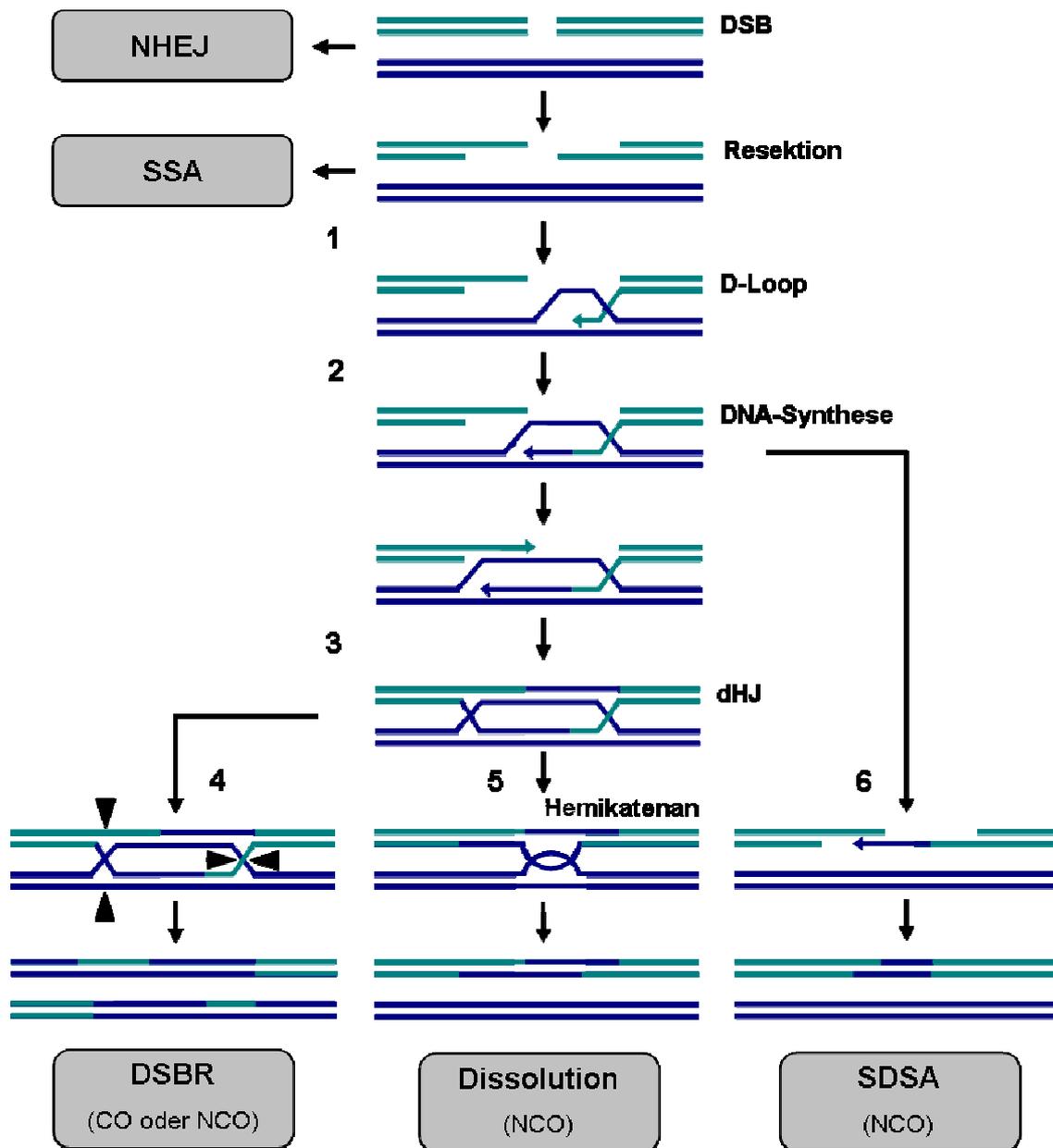


Abbildung 1.2: Reparatur durch homologe Rekombination. Ein DSB kann durch verschiedene Mechanismen repariert werden. Neben den Mechanismen des NHEJ und des SSA ist die HR eine weitere Möglichkeit. Nach Resektion zum Erhalt der nötigen freien 3'-Überhänge erfolgt die Einzelstrang-Invasion und dadurch die Ausbildung eines D-Loops (1). Mittels des intakten Matrizenstrangs wird der invadierte Strang verlängert (2). Anschließend hat die Zelle drei Möglichkeiten dieses Rekombinationsintermediat aufzulösen. DSBR: Durch die Strang-Invasion und Neusynthese von beiden gebrochenen Enden ausgehend kommt es zur Ausbildung einer doppelten Holliday Junction (dHJ; 3). Die Auflösung der dHJ durch Endonukleasen (schwarze Dreiecke) resultiert in rekombinierten DNA-Strängen mit oder ohne Crossover (CO oder NCO; hier wird nur CO gezeigt; 4). Dissolution: Die ausgebildete dHJ resultiert durch die Prozessierung mittels einer RecQ-Helikase in einem Hemikatenan, welches anschließend durch eine Typ IA Topoisomerase aufgelöst wird. Es können nur NCOs entstehen (5). SDSA: Bevor es zur Ausbildung einer dHJ kommt, löst sich der verlängerte Strang aus dem D-Loop, paart sich mit dem zweiten Ende des DSB und ermöglicht so die Neusynthese des zweiten Strangs (6).

Double strand break repair

Alternativ können DSBs mit Hilfe des Doppelstrangbruchreparaturmodells (*double strand break repair*, DSBR) repariert werden. Nach Einzelstrang-Invasion wird der D-Loop verlängert bis der verdrängte Donor-Strang komplementär zu dem zweiten freien Ende des DSB ist und dessen Binden ermöglicht. Durch die anschließende Neusynthese von beiden gebrochenen Enden ausgehend kommt es zur Ausbildung von zwei X-förmigen DNA-Strukturen, der doppelten Holliday Junction (dHJ, Szostak *et al.*, 1983). Die weitere Prozessierung des entstandenen Rekombinationsintermediats ist für die Zelle besonders wichtig. Eine bleibende Verknüpfung der beiden dsDNA Moleküle könnte beispielsweise während der Transkription oder der Zellteilung zu erneuten Brüchen führen. Nach Szostak *et al.* (1983) erfolgt die Auflösung der dHJ durch spezielle Endonukleasen. Diese sogenannten Resolvasen binden an die beiden HJ und schneiden diese. Durch eine Ligase werden die Brüche geschlossen und die Doppelstränge wieder voneinander getrennt. Abhängig von der Orientierung der Schnitte zueinander resultiert diese Auflösung entweder in einem Crossover (CO) oder NCO (Abbildung 1.2).

Dissolution

Im Jahr 1988 schlugen Thaler und Stahl erstmals ein Modell zur Auflösung von dHJ ohne die Aktivität von Resolvasen vor. Bei dieser sogenannten *Dissolution* werden die Kreuzungspunkte der dHJ mittels einer RecQ-Helikase zusammengeschoben (*branch migration*), sodass eine hemicatenane Struktur entsteht. Diese Struktur wird durch eine Typ IA Topoisomerase aufgelöst (Wu und Hickson, 2003). Mit dem Strukturprotein RMI1 wurde ein weiteres Protein identifiziert, welches beim *Dissolution*-Mechanismus eine wichtige Rolle spielt, indem es mit dem RecQ-Helikase/Topoisomerase-Komplex interagiert und diesen stabilisiert. Die Komponenten dieses RTR-Komplexes sind evolutionär stark konserviert (Abbildung 1.2; Chang *et al.*, 2005, Yin *et al.*, 2005, Hartung *et al.*, 2008, Übersicht in Daley *et al.*, 2013).

In somatischen Zellen wird die DSB-Reparatur mittels NHEJ (vgl. Abschnitt 1.3.1) der HR bevorzugt. Der Grund dafür ist, dass eukaryotische Genome zu einem Großteil aus nichtkodierenden repetitiven Sequenzen bestehen. Werden in diesen Bereichen DSBs durch die zwar fehlerhafte aber dafür energetisch günstigere und schnellere NHEJ repariert, haben die daraus resultierenden Insertionen und Deletionen keine größeren negativen Auswirkungen. Diese Sequenzveränderungen würden nur in kodierenden Bereichen in schädlichen Mutationen resultieren. Die DSB-Reparatur mittels HR könnte in diesen repetitiven Bereichen hingegen negative Folgen haben, da der Mechanismus nicht zwischen verschiedenen Chromosomen unterscheiden kann. Dies hätte COs zwischen nicht-homologen Chromosomen zur Folge. In

kodierenden Bereichen muss die HR ebenfalls reguliert werden. Hier kann es durch Rekombinationsereignisse zu einem Verlust der Heterozygotie kommen. Für den Erhalt der Genomstabilität ist eine kontrollierte HR besonders wichtig. Die Regulation wird unter anderem durch HR-supprimierende Helikasen gewährleistet.

1.3.4 Nicht-homologe und homologe Rekombination an den Telomeren

Sobald die Telomere nicht mehr von den Telomer-Binde Proteinen geschützt werden, werden sie von der Zelle als Schaden erkannt und mittels NHEJ oder HR repariert. Es können Chromosomenverknüpfungen und eine fehlerhafte Chromosomenverteilung auftreten, was letztendlich den Zelltod zur Folge hat.

NHEJ

Bei der NHEJ werden die freien Enden eines DSB miteinander ligiert. Bei diesem Prozess bindet zunächst das KU70/KU80 Heterodimer, woraufhin weitere NHEJ-Proteine zum DSB rekrutiert und aktiviert werden (vgl. Abschnitt 1.3.1).

In Säugern führt der Verlust von TRF2 zur Prozessierung der Telomere mittels NHEJ. Massive Telomerverknüpfungen sind die Folge (Celli und de Lange, 2005). Werden die Kinetochore eines so entstandenen dizentrischen Chromosoms während der Anaphase zu den unterschiedlichen Polen gezogen, kann es zu einem erneuten Bruch und der daraus resultierenden Chromosomenfusion kommen. Dieser zyklische Prozess wurde erstmals im Jahr 1939 von Barbara McClintock beschrieben und wird als *breakage-fusion-bridge cycle* bezeichnet (Abbildung 1.3). Der Einfluss von KU auf die Telomere ist in den verschiedenen Organismen unterschiedlich. Während im Menschen und in Hefe Mutationen in *KU* zu kürzeren Telomeren führen, haben *ku*-Mutanten in *A. thaliana* längere Telomere als der Wildtyp (Übersicht in Gallego und White, 2005). In *A. thaliana* konnten die längeren Telomere in der Mutante mit einer fehlenden negativen Regulation der Telomerase erklärt werden (Riha und Shippen, 2003). Zudem konnte in *A. thaliana* gezeigt werden, dass KU sowohl ALT unterdrückt als auch der Bildung von *telomeric circles* (T-Circles) entgegenwirkt (Zellinger *et al.*, 2007). T-Circles entstehen bei einer fehlerhaften Auflösung der T-Loops. Darüber hinaus wurden in den Mutanten keine Telomerverknüpfungen beschrieben, wie es sowohl in Mäusen als auch in Hefe der Fall ist (Bailey *et al.*, 1999; DuBois *et al.*, 2002; Riha *et al.*, 2002).

Die Funktion von NHEJ an den Telomeren ist in Eukaryoten sehr vielseitig: Einerseits wird durch diesen Mechanismus die Telomerintegrität gefährdet, andererseits wirken einige der NHEJ-Proteine schützend auf die Telomere.

HR

Neben der NHEJ kann es auch über HR zur fehlerhaften Rekombination zwischen den Telomeren und zu Chromosomenverknüpfungen kommen. In Säugern verhindert TRF2 die Rekombination. In Mauszellen führt eine gleichzeitige Mutation von *KU70* und *TRF2* zu einem erhöhten Schwesterchromatid-Austausch an den Telomeren (*telomeric sister chromatid exchange*, T-SCE). Dieser Prozess kann die Telomere durch HR zwischen ungleichen Bereichen verlängern oder verkürzen (Celli *et al.*, 2006). In menschlichen Zellen führt eine Deletion in *TRF2* zu einer rapiden Verkürzung der Telomere. Der schützende T-Loop wird mittels HR aufgelöst. Dadurch entsteht, neben einem extrem verkürzten Telomer, ein T-Circle (Wang *et al.*, 2004). Zudem kann es zu einer Rekombination zwischen Telomeren und interstitiellen homologen Bereichen kommen, deren Rekombinationsintermediate durch ERCC1/XPF aufgelöst werden. Extrem kurze Telomere und extrachromosomale Strukturen, sogenannte *Double Minute chromosomes*, sind die Folge (Zhu *et al.*, 2003). In *A. thaliana* spielt der homologe Proteinkomplex ERCC1/RAD1 ebenfalls eine Rolle in der HR-Regulation an den Telomeren. Der Komplex schützt kurze Telomere vor HR mit interstitiellen homologen Bereichen (Vannier *et al.*, 2009).

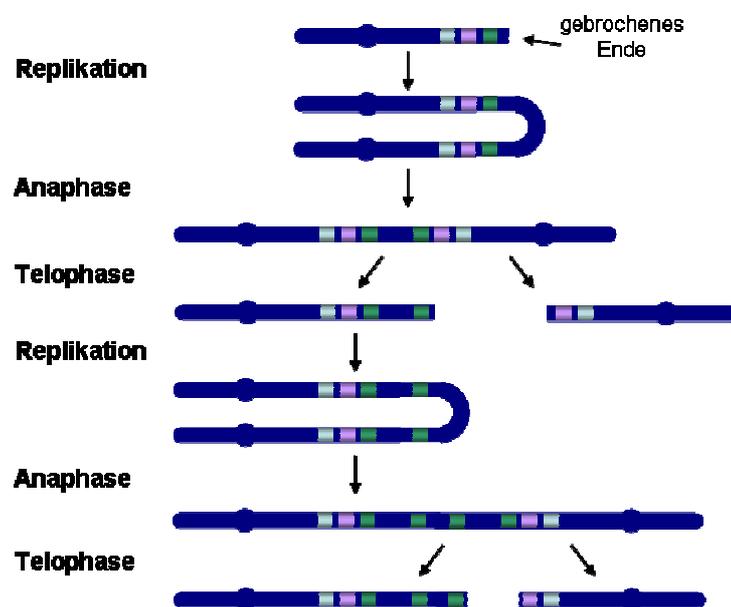


Abbildung 1.3: Modell des *breakage-fusion-bridge cycles*. Die Enden von gebrochenen Chromosomen können nach Replikation miteinander fusionieren. Es kommt zur Bildung von Telomerbrücken während der Anaphase. Werden die Kinetochores eines so entstandenen dizentrischen Chromosoms zu den unterschiedlichen Polen gezogen, kann es zu einem erneuten Bruch und der daraus resultierenden Chromosomenfusion kommen.

1.4 DNA-Helikasen

Im Normalzustand ist DNA in Form einer Doppelhelix organisiert. Sowohl bei der DNA-Replikation und Transkription, als auch bei Reparatur und Rekombination, werden einzelsträngige DNA-Intermediate benötigt (Lohman und Bjornson, 1996). Der dazu nötige DNA-Entwindungsprozess wird von DNA-Helikasen katalysiert, welche unter NTP-Verbrauch die Wasserstoffbrücken zwischen gepaarten Basen auftrennen. Helikasen sind in allen Lebewesen konserviert und bislang wurde eine Vielzahl verschiedener Helikasen entdeckt, die sich in ihrer Struktur und im Entwindungsmechanismus unterscheiden (Lohman *et al.*, 2008). Aufgrund der Fähigkeit freie, chemische Energie in mechanische Energie umzusetzen und sich entlang der DNA zu bewegen, zählen Helikasen zu den Motorproteinen (Moore und Lohman, 1995). Ursprünglich lassen sich die Helikasen anhand ihrer Helikase-Motive nach Gorbalenya und Koonin (1993) in drei Superfamilien (SF1-3) und zwei Familien (F4 und F5) einteilen. Allerdings ist diese Klassifizierung aufgrund biochemischer Charakterisierungen mittlerweile veraltet. Eine zusätzliche Familie bildet die Gruppe der AAA+ (*ATPase associated with various cellular activities*) Proteine (Erzberger und Berger, 2006; Singleton *et al.*, 2007).

Die einzelnen Helikase-Motive haben unterschiedliche Funktionen, wie zum Beispiel ATP-Bindung und -Hydrolyse, Kopplung der ATPase- und Helikase-Aktivität oder Entwindung der DNA. Geringe Änderungen in der Primärstruktur können zu unterschiedlicher Substratspezifität (RNA oder DNA) und unterschiedlicher Direktionalität (3'-5' oder 5'-3') der Helikasen innerhalb einer Superfamilie führen (Patel und Donmez, 2006).

In dieser Arbeit war die Untersuchung HR-supprimierender Helikasen, insbesondere die Charakterisierung der Antirekombinase RTEL1, von zentraler Wichtigkeit. Auf diese Helikasen wird in den nächsten Abschnitten näher eingegangen.

1.4.1 *At*RECQ4A

RecQ-Helikasen übernehmen unterschiedliche Funktionen während der DNA-Reparatur, Rekombination und Replikation und tragen durch die Regulation der HR und die Prozessierung von Rekombinationsintermediaten zur Genomstabilität bei. Nachdem RECQ erstmals in *E. coli* beschrieben wurde (Nakayama *et al.*, 1984) ist heute bekannt, dass RecQ-Helikasen in fast allen bisher beschriebenen Pro- und Eukaryoten konserviert sind. Die Anzahl der RecQ-Helikasen variiert in den verschiedenen Organismen. Wie *E. coli* besitzt *S. cerevisiae* nur ein RecQ-Homolog, SGS1. Ein Ausfall von SGS1 resultiert in Hyperrekombination (Watt *et al.*, 1996). Zudem sind *sgs1*-Mutanten hypersensitiv gegenüber Genotoxinen wie Methylmethansulfonat (MMS) und Hydroxyurea (HU; Miyajima *et al.*, 2000; Mullen *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden,

dass SGS1 eine Rolle beim Telomererhalt spielt. Beim Verlust der Telomerase wird der Telomererhalt durch den auf HR basierenden ALT-Mechanismus gewährleistet. Bei diesem Mechanismus erfolgt die Auflösung der rekombinierenden Telomerstrukturen durch SGS1 und TOP3 (Azam *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

Im Menschen sind Mutationen in drei der fünf RecQ-Homologe mit schweren Erbkrankheiten assoziiert. Mutationen in *BLM* verursachen das Bloom Syndrom (BS), dessen Symptome unter anderem Entwicklungsdefekte sowie eine Prädisposition für Krebs sind (Ellis *et al.*, 1995).

Eine Mutation von *WRN* resultiert in der Progerie-Erkrankung Werner Syndrom (WS). Dabei kommt es zu einer rapiden Verkürzung der Telomere. Ab der Pubertät altern diese Patienten schneller und haben schon in jungen Jahren die damit verbundenen Symptome wie Hautveränderungen, Diabetes mellitus Typ II, Arteriosklerose und maligne Tumore (Yu *et al.*, 1996).

Mutationen in *RECQLA* werden mit drei verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht: Dem Rothmund-Thomson Syndrom (RTS), dem RAPADILINO Syndrom und dem Baller-Gerold Syndrom (Kitao *et al.*, 1999; Siitonen *et al.*, 2003; Van Maldergem *et al.*, 2006).

In *Arabidopsis thaliana* wurden bislang sieben RecQ-Homologe beschrieben (Hartung *et al.*, 2000; Hartung und Puchta, 2006; Knoll und Puchta, 2011). Darunter weisen *AtRECQ4A* und *AtRECQ4B* die höchste Ähnlichkeit mit den RecQ Homologen *HsBLM* und *ScSGS1* auf. *AtRECQ4A* und *AtRECQ4B* gehen aus einer Genduplikation innerhalb der *Brassicaceae* hervor (Hartung *et al.*, 2000). Trotz ihrer großen Ähnlichkeit untereinander und den Homologien zu den typischen Helikase-Domänen von BLM und SGS1 übernehmen die beiden Helikasen unterschiedliche Funktionen in der Zelle (Hartung *et al.*, 2000; Hartung *et al.*, 2007). Lediglich der Verlust von RECQ4A scheint ähnliche Auswirkungen wie der Ausfall von SGS1 und BLM zu haben. Mutationen in diesen drei Helikasen führen in den Zellen zu einer Hypersensitivität gegenüber Genotoxinen, wie beispielsweise MMS (Mullen *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Hartung *et al.*, 2007). Sowohl in Hefe als auch im Menschen führen Mutationen in *SGS1* beziehungsweise *BLM* zu einem erhöhten Schwesterchromatid-Austausch. Dieser Hyperrekombinations-Phänotyp konnte ebenfalls für RECQ4A in *A. thaliana* nachgewiesen werden, was auf eine regulierende Funktion der Helikasen während der HR schließen lässt (Chaganti *et al.*, 1974; Onoda *et al.*, 2000; Hartung *et al.*, 2007; Schröpfer *et al.*, 2014). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BLM eine Rolle im Telomererhalt spielt. Durch die Fähigkeit G4-DNA-Strukturen zu entwinden, gewährleistet es eine korrekte Replikation an den G-reichen Telomeren und verhindert so eine erhöhte Telomer-Fragilität (Huber *et al.*, 2002; Sfeir *et al.*, 2009; Vannier *et al.*, 2012). Während der Meiose in *A. thaliana* ist RECQ4A ebenfalls an den Telomeren wichtig, indem es Rekombinationsintermediate auflöst (Higgins *et al.*, 2011). Zudem bildet RECQ4A zusammen

mit TOP3 α und RMI1 den RTR-Komplex in *A. thaliana*, welcher für die Auflösung von dHJ über den *Dissolution*-Mechanismus in der DSB-Reparatur benötigt wird (vgl. Abschnitt 1.3.3; Hartung *et al.*, 2008). Die gleichzeitige Mutation der RecQ-Helikase des RTR-Komplexes und der Endonuklease *MUS81* führen in vielen Organismen zur Letalität. Entsprechend verhält sich auch die Mehrfachmutanten *recq4A mus81* in *A. thaliana* (Hartung *et al.*, 2006). Die Letalität dieser Doppelmutante kann durch die zusätzliche Mutation im RAD51-Paralog RAD51C wieder aufgehoben werden (Mannuss *et al.*, 2010). RAD51C spielt eine Rolle in frühen Schritten der HR. Dies deutet daraufhin, dass RECQ4A und MUS81 in zwei unabhängigen Wegen die Auflösung toxischer Rekombinationsintermediate während der HR gewährleisten. Weiterhin kann durch eine gleichzeitige Mutation von *AtRECQ4A* und *AtTOP3a* beziehungsweise *ScSGS1* und *ScTOP3* der letale Phänotyp von *top3a* in *A. thaliana* beziehungsweise das verlangsamte Wachstum der *top3*-Mutante in Hefe aufgelöst werden. Dies ist darin begründet, dass sich durch den Verlust von RECQ4A/SGS1 keine toxischen Rekombinationsintermediate mehr ansammeln, für dessen Auflösung eine funktionelle Topoisomerase essentiell wäre (Übersicht in Knoll *et al.*, 2014). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl die Helikaseaktivität als auch der N-terminale Bereich von RECQ4A essentiell für die Regulierung der HR sind (Schröpfer *et al.*, 2014).

1.4.2 FANCM

Die Fanconi Anämie (FA) ist eine rezessive Erbkrankheit, die erstmals 1927 durch Guido Fanconi beschrieben wurde. Die Patienten weisen eine Vielzahl von Symptomen auf. Neben Knochenmarksinsuffizienz und der damit einhergehenden, Namen gebenden Anämie leiden die Patienten unter Entwicklungsstörungen, Fehlbildungen und einer erhöhten Krebsanfälligkeit. Die Krankheit kann durch homozygote Mutationen in 16 verschiedenen Genen verursacht werden. Trotz der Vielzahl an möglichen Mutationen, die diese Krankheit auslösen können und der zahlreichen Symptome, die durch diese Krankheit verursacht werden, teilen FA-Patienten einen gemeinsamen zellulären Phänotyp: Die Zellen sind hypersensitiv gegenüber Genotoxinen, die DNA-Interstrangverknüpfungen (*interstrand crosslinks*, ICLs) verursachen. Durch Mutationen der FA-Proteine können diese ICLs nicht mehr repariert werden. Es kommt zu Störungen während Transkription, Replikation und Mitose. Spontane Chromosomenbrüche sowie radiale Chromosomen sind die Folge (Hanlon Newell *et al.*, 2008).

Die meisten der FA-Proteine bilden einen Komplex, den sogenannten FA *core complex*. Trifft eine Replikationsgabel auf einen ICL, bleibt die Replikationsgabel stehen. Nach Erkennung des Schadens kommt es durch den FA *core complex* zu einer Monoubiquitinierung des Heterodimers

FANCD2/FANCI, woraufhin dieses zum Schaden rekrutiert wird und dort weitere FA-Proteine und andere Reparaturfaktoren aktiviert. Der FA *core complex* selbst wird durch das FA-Protein FANCM zur Läsion geführt. Das menschliche FANCM besitzt eine SF2 Helikasedomäne, die sowohl über eine ATPase-Aktivität als auch über eine DNA-Translokase-Aktivität verfügt. Eine Helikase-Aktivität konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Translokase-Aktivität eine *branch migration* von HJs ermöglicht (Gari *et al.*, 2008a; Gari *et al.*, 2008b). Möglicherweise gewährleistet die Translokase-Aktivität den Transport des FA *core complex* entlang der DNA zum ICL.

Im Gegensatz zu *Hs*FANCM besitzt MPH1, das FANCM-Homolog in Hefe, eine Helikase-Aktivität (Prakash *et al.*, 2005a). Des Weiteren wurde die Beteiligung von MPH1 an der Reparatur von ICLs nicht nachgewiesen. Dennoch konnte durch hypersensitive *mph1*-Mutanten gegenüber Genotoxinen, wie beispielsweise MMS, eine Rolle von MPH1 an angehaltenen Replikationsgabeln festgestellt werden (Scheller *et al.*, 2000). Zudem häufen die Mutanten diverse Punktmutationen im Genom an, die auf die fehleranfälligen Transläsionspolymerasen REV1 und REV3 zurückzuführen sind. MPH1 wird daher mit einer Funktion in der fehlerfreien Schadensumgehung in Verbindung gebracht. Eine gleichzeitige Mutation von *SGS1* und *MPH1* führt in Hefe zu einer höheren HR-Rate als in beiden Einzelmutanten, was die beiden Proteine in zwei unabhängigen HR-regulierenden Mechanismen platziert (Schürer *et al.*, 2004). Die Verbindung von MPH1 mit HR und Transläsionssynthese positioniert die Helikase an eine Verzweigungsstelle bei der Wahl des Reparaturwegs an geschädigten Replikationsgabeln. Durch seine zentrale Rolle im FA *core complex* übernimmt FANCM eine ähnliche Funktion. Die Rolle des FANCM/MPH1-Homologs in *A. thaliana* wurde erst kürzlich durch Knoll *et al.* (2012) beschrieben. Für die *fancm* Einzelmutante in *A. thaliana* konnte ebenfalls keine Hypersensitivität gegenüber ICLs nachgewiesen werden. Auch eine Hypersensitivität der *Atfancm*-Mutanten gegenüber anderen Genotoxinen konnte nicht gezeigt werden. Durch Untersuchung der Doppelmutante *fancm recq4A* in *A. thaliana* konnte jedoch erst kürzlich eine Rolle von *AtFANCM* in der Reparatur von ICLs gezeigt werden. Eine gleichzeitiger Verlust von *AtFANCM* und der RecQ-Helikase *AtRECQ4A* führt zu einer höheren Sensitivität gegenüber ICLs als in der *recq4A* Einzelmutante, was auf zwei unabhängige Wege in der Reparatur von ICLs schließen lässt (Dangel *et al.*, 2014). Bezüglich der HR konnte für *AtFANCM* eine ähnliche Funktion wie für MPH1 festgestellt werden. Auch hier führt eine gleichzeitige Mutation von *RECQ4A* (*SGS1*-Homolog) und *FANCM* zu einer höheren HR-Rate als in beiden Einzelmutanten, was auf zwei parallele HR-unterdrückende Wege schließen lässt. Anders als in Hefe führt in *A. thaliana* die Induktion von DSBs durch das Genotoxin Bleomycin in *fancm*-Mutanten jedoch zu einer geringeren HR-Rate als im Wildtyp, was auf eine HR-fördernde Wirkung von FANCM schließen

lässt. Nach Induktion durch das *Crosslink* (CL)-verursachende *cis*-Platin ist die HR-Rate in den Mutanten allerdings erhöht. Dies deutet daraufhin, dass *AtFANCM* eine HR-supprimierende Rolle an Replikationsgabeln spielt. Weiterhin konnte eine Funktion von FANCM in der Regulation von meiotischen COs nachgewiesen werden (Crismani *et al.*, 2012; Knoll *et al.*, 2012).

1.4.3 SRS2

Durch ihre CO-unterdrückende Funktion während der HR zählt die DNA-Helikase SRS2 in Hefe zu den Antirekombinasen. Sie wurde erstmals von Lawrence und Christensen (1979) beschrieben. Mutanten weisen eine erhöhte HR-Rate auf und sind hypersensitiv gegenüber einer Reihe von Genotoxinen, wie beispielsweise UV-Strahlung oder ICL-verursachende Genotoxine (Aguilera und Klein, 1988; Birrell *et al.*, 2002). Der gleichzeitige Verlust von SRS2 und der RecQ-Helikase SGS1 führt zur synthetischen Letalität (Lee *et al.*, 1999), da sich in der Doppelmutante toxische Rekombinationsintermediate ansammeln. Der letale Phänotyp lässt sich durch einen Mutation in *RAD51* oder *RAD54*, welche für die Ausbildung des Nukleoproteinfilaments und die Verlängerung des invasiven Strangs wichtig sind, wieder aufheben (Gangloff *et al.*, 2000; Klein, 2001). Mittels biochemischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass SRS2 der HR entgegenwirkt, indem es die Rekombinase RAD51 von der ssDNA entfernt und dadurch die Stranginvasion des Nukleoproteinfilaments verhindert (Veaute *et al.*, 2003).

Die Wirkung von SRS2 als Antirekombinase wurde von Dupaigne *et al.* im Jahr 2008 näher beschrieben: Nach der Einzelstrang-Invasion und der Bildung eines D-Loops bindet RPA an den verdrängten Strang, während RAD51 mit der Heteroduplex-DNA ein Nukleoproteinfilament bildet. SRS2 bindet an den verdrängten Einzelstrang und bewegt sich mittels der Translokase-Aktivität in 3'-5'-Richtung auf die Verzweigungsstelle des Heteroduplex zu. An der Verzweigungsstelle ermöglicht SRS2 entweder die Bindung weiterer SRS2-Moleküle oder es erfolgt ein Strangwechsel auf den Matrizen-Strang. Durch die Interaktion zwischen SRS2 und RAD51 wird RAD51 von der DNA entfernt und die Heteroduplex-Struktur letztendlich aufgelöst. Die anschließende DSB-Reparatur mittels SDSA lässt nur NCOs zu (Abbildung 1.4).

In Tieren, außer in Knochenfischen und Säugern, und in allen Pflanzen konnten mögliche Homologe für SRS2 gefunden werden (Blanck *et al.*, 2009). Funktionelle Analysen sind bisher allerdings nicht für alle Organismen bekannt. Für *A. thaliana* konnte mittels biochemischen Untersuchungen gezeigt werden, dass es sich bei dem Protein *AtSRS2* um eine funktionelle 3'-5' Helikase handelt, die wichtig bei der Auflösung von Rekombinationsintermediaten ist (Blanck *et al.*, 2009). Eine essentielle Funktion von *AtSRS2 in vivo* konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Knoll, 2011).

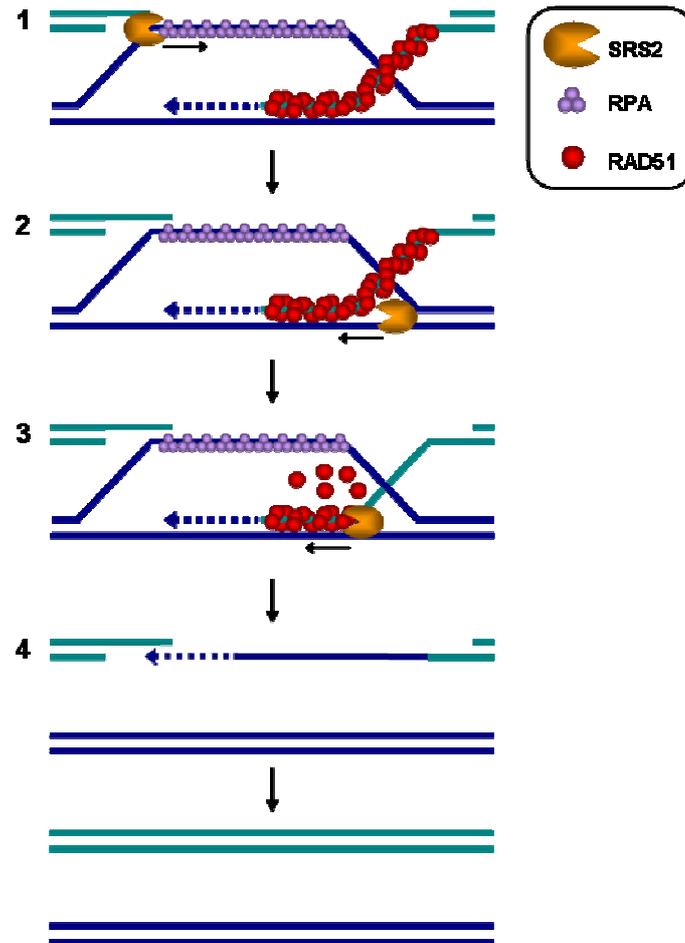


Abbildung 1.4: Modell zur Wirkung der Antirekombinase *ScSRS2*. Während der HR bindet SRS2 nach der Einzelstrang-Invasion an den verdrängten Einzelstrang und bewegt sich auf die Verzweigungsstelle des Heteroduplex hinzu (1). Durch ein weiteres SRS2-Molekül oder durch einen Strangwechsel kommt es zur Interaktion von SRS2 mit der Rekombinase RAD51 (2). RAD51 wird letztendlich durch SRS2 vom DNA-Strang entfernt und die Heteroduplex-Struktur aufgelöst (3). Die Reparatur erfolgt mittels SDSA (4). Verändert nach Dupaigne *et al.*, 2008.

Mit FBH1 wurde eine weitere Antirekombinase in Eukaryoten beschrieben. In *S. pombe* ist die Helikase FBH1 wichtig für die Verarbeitung von Rekombinationsintermediaten und ihre Funktion überschneidet sich mit der von SRS2 (Morishita *et al.*, 2005). Zudem kann die Expression des menschlichen FBH1 einen Teil der Rekombinationsschäden in der *srs2*-Hefemutante wieder aufheben (Chiolo *et al.*, 2007). Da es kein SRS2-Homolog in Säugern gibt und sich die Funktionen der beiden Proteine SRS2 und FBH1 überschneiden, könnte es sich bei FBH1 um ein funktionelles Analogon von SRS2 handeln, welches die wichtige Rolle in der HR-Regulation und damit in der Aufrechterhaltung der Genomstabilität übernimmt.

FBH1 ist jedoch nicht in *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila* und *A. thaliana* vorhanden (Kim *et al.*, 2002; Kohzaki *et al.*, 2007).

1.4.4 RTEL1

Die DNA-Helikase RTEL1 (*regulator of telomere elongation helicase 1*) wurde erstmals in Mäusen identifiziert. Mittels genomischer Kartierung wurde ein Chromosom-Bereich identifiziert, der die unterschiedliche Telomer-Länge zwischen *Mus musculus* und *Mus spretus* kontrolliert. Unter den möglichen Kandidatengenen wurde RTEL1 festgestellt (Zhu *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2004). RTEL1 ist eine RAD3-ähnliche Helikase mit einer Eisen-Schwefel-Domäne. Dadurch lässt sich die Helikase in eine kleine Gruppe zusammen mit den Helikasen XPD, FANCI und CHL1 zusammenfassen. Mutationen in *XPD*, *FANCI* und *CHL1* führen zu den Erbkrankheiten Xeroderma pigmentosum (XP) Fanconi-Anämie (FA) beziehungsweise *Warsaw Breakage* Syndrom (WABS; Rudolf *et al.*, 2006; van der Lelij *et al.*, 2010).

Ein Verlust von RTEL1 führt in *M. musculus* zu einer fehlerhaften Zellproliferation, vor allem in sich schnell teilenden Geweben, was letztendlich in Embryoletalität resultiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass RTEL1 wichtig für den Telomererhalt ist. *rtel1*-Mutanten weisen abnormale Chromosomen mit Telomerverknüpfungen auf. Zudem sind die Telomere kürzer als bei gesunden Mäusen (Ding *et al.*, 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass RTEL1 T-Loops auflöst und G-Quadruplexe (G4-DNA) an Telomeren entgegenwirkt (Vannier *et al.*, 2012). Die beiden Wirkungsweisen von RTEL1 an den Telomeren fassten Vannier *et al.*, 2012 in folgenden Modellen zusammen. RTEL1 entwindet den T-Loop, indem es das invadierte 3'-Ende vom Telomer aus dem Duplex herauslöst und so eine korrekte und vollständige Replikation an den Telomeren zulässt. Beim Verlust von RTEL1 werden die T-Loops durch den SLX4-Nuklease-Komplex aufgelöst. Bei diesem inadäquaten Mechanismus sind T-Circles die Folge. Es kommt zur rapiden Verkürzung der Telomere und zum Telomer-Verlust (Abbildung 1.5 A).

Durch die Guanin-reiche Sequenzwiederholung an den Telomeren kann sich G4-DNA ausbilden. Dabei assoziieren vier Guaninbasen über Hoogsteen-Basenpaarungen. Von diesen Guanin-Tetraden können sich mehrere übereinanderlagern. Für eine vollständige Replikation an den Telomeren ist die Entwindung dieser G4-Strukturen sehr wichtig. Für die Entwindung werden RTEL1 und BLM von TRF1 an die Telomere rekrutiert. Beide DNA-Helikasen wirken in zwei unabhängigen Wegen. Eine Abwesenheit der beiden Helikasen führt zu einer erhöhten Telomer-Fragilität (Abbildung 1.5 B; Sfeir *et al.*, 2009; Vannier *et al.*, 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass RTEL1 über ein PCNA-Interaktionsmotiv (PIP Box) mit PCNA interagiert. PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) ist ein Ringklemmenprotein, welches während der Replikation verhindert, dass die DNA-Polymerase vom DNA-Strang dissoziiert. Der Verlust der RTEL1-PCNA-Interaktion führt aufgrund einer erhöhten Anzahl spontaner DNA-Schäden zu Wachstumsarrest und Seneszenz. Während die Auflösung der T-Loops zur Gewährleistung einer

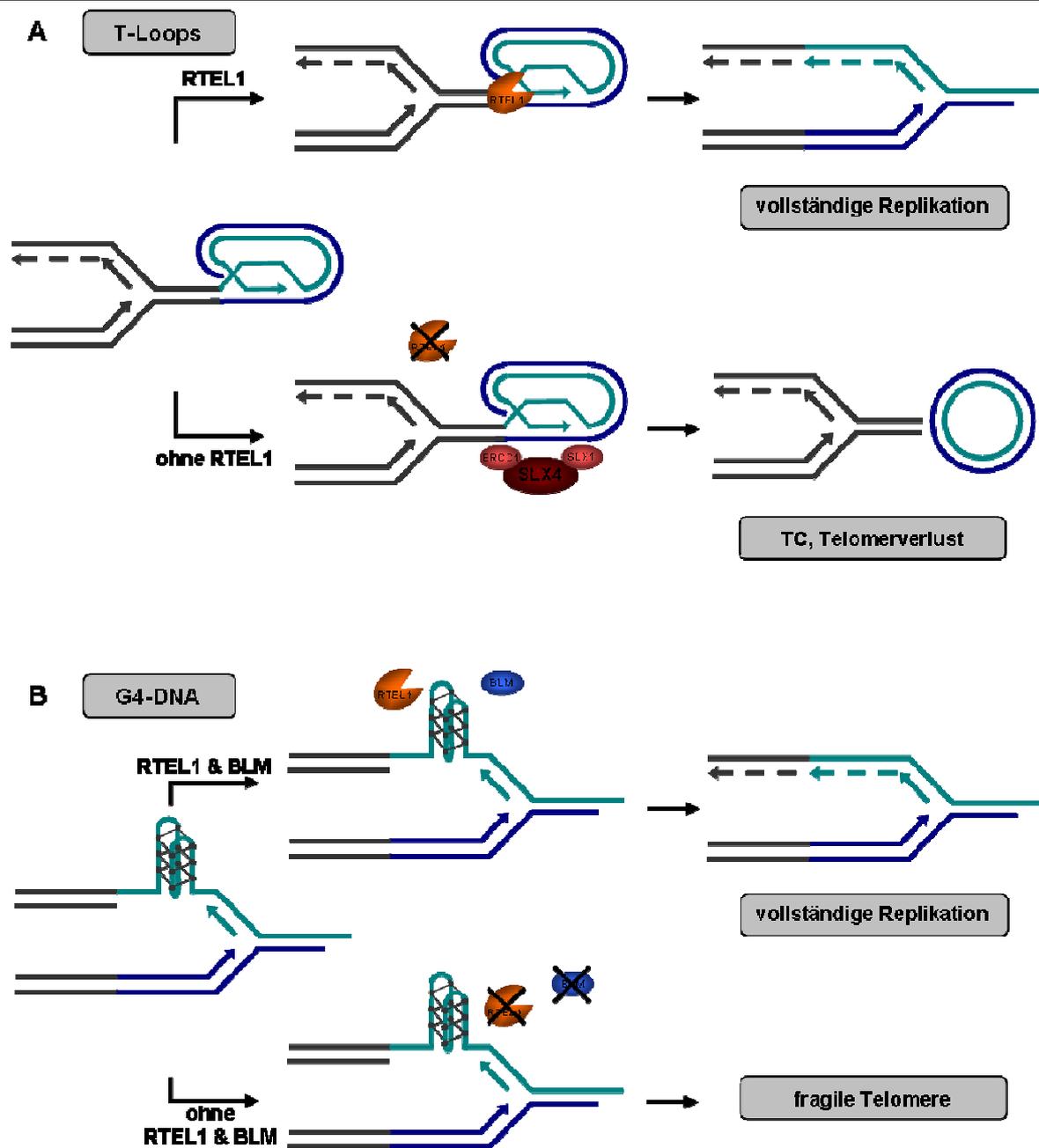


Abbildung 1.5: Modell zur Wirkung von RTEL1 an den Telomeren in Mäusen. RTEL1 übernimmt während der Replikation der Telomere eine duale Rolle. **A)** RTEL1 ist wichtig zur korrekten Auflösung von T-Loops. In Abwesenheit von RTEL1 werden T-Loops durch den SLX4-Komplex aufgelöst. *Telomeric circles* (TC) und ein rapider Telomerverlust sind die Folge. **B)** RTEL1 ist in einem von BLM unabhängigen Mechanismus wichtig für die Unterdrückung von G4-DNA, welche die Replikation behindert und so zu Telomer-Fragilität führt.

korrekten Replikation PCNA-unabhängig ist, ist die PCNA-Interaktion zur Entwindung von G4-Strukturen an den Telomeren essentiell (Vannier *et al.*, 2013).

Auch im Menschen trägt RTEL1 zum Erhalt der Genomintegrität bei. In unabhängigen Studien wurde erst kürzlich gezeigt, dass Mutationen in RTEL1 das Hoyeraal-Hreidarsson Syndrom verursachen. Dabei handelt es sich um eine schwerere Variante von Dyskeratosis Congenita. Dyskeratosis Congenita wird durch Defekte in der Telomerase verursacht. Die Folgen sind unter

anderem Knochenmarksinsuffizienz, eine abnorme Hautpigmentierung, Nageldystrophie und Leukoplakie sowie eine Prädisposition für Krebs. Beim Hoyeraal-Hreidarsson Syndrom werden zudem Symptome wie Immuninsuffizienz, Kleinhirnhypoplasie und vorgeburtliche Entwicklungsstörungen beobachtet (Ballew *et al.*, 2013a; Ballew *et al.*, 2013b; Le Guen *et al.*, 2013; Walne *et al.*, 2013). Weiterhin werden Mutationen in RTEL1 mit einer erhöhten Anfälligkeit für Gliome in Verbindung gebracht (Liu *et al.*, 2010; Egan *et al.*, 2011).

Wie bereits erwähnt, ist mit SRS2 ein wichtiger Gegenspieler der HR in Hefe bekannt, der allerdings nicht in allen Eukaryoten konserviert ist (vgl. Abschnitt 1.4.3). Untersuchungen des RTEL1-Homologs in *C. elegans* zeigen, dass dieses Protein eine weitere Antirekombinase darstellt, welche einige funktionelle Ähnlichkeiten mit SRS2 aufweist (Barber *et al.*, 2008). Mutationen der beiden Helikasen haben ähnliche Auswirkungen auf den Phänotyp: Genau wie bei der Doppelmutante *srs2 sgs1* in Hefe kommt es auch bei einer gleichzeitigen Mutation von *RTEL1* und *HIM6* (*SGS1*-Homolog) in *C. elegans* zu einer Ansammlung toxischer Rekombinationsintermediate und der daraus resultierenden Letalität (Lee *et al.*, 1999; Barber *et al.*, 2008). Des Weiteren regulieren sowohl SRS2 in Hefe als auch RTEL1 in *C. elegans* die HR negativ, indem sie D-Loop-Rekombinationsintermediate abbauen. Zudem sind beide Helikasen wichtig für die Reparatur von ICLs (Birrell *et al.*, 2002; Veaute *et al.*, 2003; Barber *et al.*, 2008). In *C. elegans* ist RTEL1 außerdem wichtig für die Regulation der Meiose. Hier beeinflusst RTEL1 die Rekombination und CO-Homöostase, indem es die Stranginvasion unterbricht und die NCO-Reparatur mittels SDSA fördert (Youds *et al.*, 2010).

1.5 Ziele der Arbeit

Die homologe Rekombination ist für alle Lebewesen von besonderer Wichtigkeit. Neben der Erzeugung genetischer Vielfalt in der Meiose dient die HR außerdem der Reparatur von DSBs und der Auflösung aberranter DNA-Strukturen an Replikationsgabeln. Zur Gewährleistung der Genomstabilität ist die Regulation der HR und die Koordination mit dem Zellzyklus und der Replikation sehr wichtig. Durch ihre Eigenschaft DNA zu entwinden übernehmen DNA-Helikasen wichtige Aufgaben während der Regulation der HR.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Funktionen der DNA-Helikasen RTEL1 in *A. thaliana* näher untersucht werden. In *C. elegans* konnte bereits gezeigt werden, dass RTEL1 eine unterdrückende Wirkung auf die HR hat und zudem wichtig für die Reparatur von DNA-Crosslinks ist. In Mäusen und Menschen wurde eine Funktion von RTEL1 in der Telomerhomöostase beschrieben.

Mittels molekulargenetischer Methoden sollte die Rolle des RTEL1-Homologs in *A. thaliana* untersucht werden. Dazu sollten die Funktionen von RTEL1 in der somatischen HR sowie in der DNA-Reparatur ermittelt werden. Es sollte ein System etabliert werden, welches die gezielte Untersuchung der Stammzellen im Wurzelmeristem ermöglichte, um so die Rolle von RTEL1 bei der Reparatur Replikations-assoziiierter Schäden bestimmen zu können. Weiterhin sollten mögliche Funktionen von RTEL1 in der Telomerstabilität aufgeklärt werden. Die Erzeugung und Untersuchung von Doppelmutanten sollten eine Einordnung in verschiedene Rekombinations- und Reparaturwege ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 Geräte

Heizblöcke, Schüttler, Inkubatoren

- Anzuchtschrank CU-36L4 (Percival Scientific, Inc., Perry, USA)
- Inkubationsschüttler 3032 (GFL GmbH, Burgwedel)
- Thermoblock Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg)
- Trockenschrank Modell UE 500 (Mettler GmbH + Co. KG, Schwabach)

Mikroskope, Binokulare

- Binokular SZB 300 (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Fluoreszenzbinokular SZX12 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) mit Digitalkamera Color View II
- LSM 700 Laser Scanning Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) mit Zeiss AxioCam HRm

Reinraumbänke

- Et130V Sicherheitswerkbank (Ehret GmbH und Co. KG, Emmendingen)
- NU-480 Sicherheitswerkbank (INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald)
- Reinraumbank Typ KVF (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Genkingen)

- Uniflow UVU 700 (UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg)

Thermocycler

- FlexCycler (Analytic Jena AG, Jena)
- iCycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg)
- MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- SensoQuest Labcycler 48 (SensoQuest GmbH, Göttingen)
- Tpersonal Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen)

Southern Blot

- BAS-Cassetten 2040 (Fujifilm, Tokyo, Japan)
- CR 35 Bio High Speed Image Plate Scanner (DÜRR NDT GmbH & Co. KG, Division DÜRR MEDICAL, Bietigheim-Bissingen)
- Imaging Plate 20x40 (Fujifilm, Tokyo, Japan)
- Nylon Transfermembran Hybond-NX (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)
- S&S TurboBlotter (Schleicher & Schüll BioScience GmbH, Dassel)

Waagen

- 440-47 (Kern und Sohn GmbH, Balingen)
- Feinwaage AB104-S (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)

Zentrifugen

- CM-70 M.07 Schüttelzentrifuge (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg)
- MiniSpin (Eppendorf AG, Hamburg)
- Z 233 M-2 (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)
- Z 383 K (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen)

Sonstige

- Elektroporator: Gene Pulser II mit Puls Controller Plus und Capacitance Extender Plus (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- GEL iX Imager Geldokumentationssystem (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen)

- PURELAB Classic Reinstwasseranlage (ELGA LabWater, Celle)
- Qubit Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- TKA high purity water system (Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert)

2.1.2 Software und Datenbanken

- AIDA Images Analyzer Software 4.50
- analySIS^B5.0 (Olympus Bio-Systems GmbH, Planegg)
- ClustalW2 (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>; letzter Zugriff: 26.03.2014)
- ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, USA)
- InterProScan (European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>; letzter Zugriff: 26.03.2014)
- Lasergene Suite 5.03 (DNASStar Inc., Madison, USA)
- LightCycler 480 Software 1.5.1.62 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- LSM Software ZEN 2011 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)
- NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- OligoAnalyzer 1.0.3 (Kuulasmaa; Kuopio, Finland)
- SmartRoot 3.7 (Lobet *et al.*, 2011)
- TAIR - The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/>; letzter Zugriff: 23.05.2014)

2.1.3 Chemikalien

Alle Standardchemikalien werden nicht weiter aufgeführt. Sie wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, Niederlande), Fluka AG (Buchs), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und VWR International GmbH (Darmstadt) bezogen und sind in der Regel in *p. a.* Qualität.

- Acetosyringon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Agarose SeaKem LE Agarose (Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz)
- Beef-Extrakt (GERBU Biotechnik GmbH, Wieblingen)
- dNTP-Gemisch 10 mM (Fermentas Life Sciences GmbH, St. Leon-Rot)
- 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)
- Silwet Gold (Hermann Meyer KG, Rellingen)
- Vectashield Mounting Medium mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Vector Labs, Peterborough, UK)
- X-GlcA ((5-Brom-4-chlor-3-indolyl-*b*-D-glucuronid)cyclohexyl-Ammoniumsalz) (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)

2.1.4 Medien, Lösungen, Puffer

DNA-Isolierung

- DNA-Extraktionspuffer
 - 0,35 M Sorbitol
 - 0,1 M Tris
 - 5 mM EDTA
 - pH 7,5 mit HCl
- Isolierungspuffer:
 - 800 µl 0,1 % Natriumsulfit
 - 4,2 ml DNA-Extraktionspuffer
 - 4,2 ml Nuclei-Lysis-Puffer
 - 800 µl 5 % Sarkosyllösung
- Nuclei-Lysis-Puffer:
 - 0,2 M Tris
 - 50 mM EDTA
 - 2M NaCl
 - 2% Hexadecyl-trimethylammoniumbromid (CTAB)
 - pH 8,0 mit HCl
- Sarkosyllösung:
 - 5 % Sarkosyl
- Shorty-Extraktionspuffer:
 - 0,2 M Tris/HCl (pH 9,0)

0,4 M LiCl
25 mM EDTA
1 % SDS

- TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl
1 mM EDTA
pH 8,0

Histochemische Färbung

- Natriumphosphat-Puffer (100 mM):
17,8 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O
pH 7 mit H₃PO₄
- X-GlcA-Färbelösung:
2,5 ml 1 % X-GlcA-Stammlösung (in Dimethylformamid)
1 ml 5 % Na-Azid-Lösung (in ddH₂O)
mit 100 mM Natriumphosphat-Puffer auf 50 ml auffüllen

Medien zur Anzucht von Pflanzen und Bakterien

- 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 MgSO₄

17 g/l Agar für Festmedien

Die Medien wurden nach Einstellen des pH-Werts autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurde die angegebene Menge Plant-Agar zugegeben. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte erst nach Abkühlen des Mediums auf circa 50 °C.

Pollenvitalität

- Alexander-Färbelösung:
 - 1 ml Ethanol (95 %)
 - 100 µl Malachitgrünlösung (1 %)
 - 2,5 ml Glycerin
 - 1 ml Phenol
 - 0,5 g Chloralhydrat
 - 500 µl 1 % (w/v) Fuchsinlösung
 - 50 µl 1 % (w/v) Orange G
 - 400 µl 100 % Essigsäure
 - mit ddH₂O auf 10 ml auffüllen
- Carnoy:
 - 6 ml 99,5 % Ethanol (reinst)
 - 3 ml Chloroform
 - 1 ml 100% Essigsäure

Southern Blot

- Denaturierungspuffer:
 - 0,5 M NaOH
 - 1,5 M NaCl
- Hybridisierungs-Lösung
 - 0,13 M NaH₂PO₄ x H₂O
 - 0,24 M SDS
 - 1% BSA
 - 0,2 % denaturierte Hering-Sperma-DNA
- Neutralisierungspuffer:
 - 1,5 M NaCl
 - 0,5 M Tris/HCl (pH 7,0)

- SSC-Transfer-Puffer (20x):
3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat
pH 7,0
- Waschlösung I:
2x SSC-Transferpuffer
0,5 % SDS
- Waschlösung II
0,1x SSC-Transfer-Puffer
0,1 % SDS

Transformation von *Arabidopsis thaliana*

- Infiltrationsmedium:
2 g Murashige & Skoog Fertigmedium
40 g Saccharose
3,4 µl 0,1 % Benzylaminopurin (BAP)
Mit ddH₂O auf 800 ml auffüllen
pH 5,7 mit KOH
800 µl 10 % Acetosyringon

2.1.5 Genotoxine und Antibiotika

Genotoxine

- Bleomycinsulfat (Selleck Chemicals, Houston, USA)
- *cis*-Diamin-dichlorid-platin(II) (*cis*-Platin) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Mitomycin C (MMC) (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)

Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika sind zusammen mit den jeweils eingesetzten Konzentrationen in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Antibiotika. C_{Stock} : Stockkonzentration. Die verschiedenen Konzentrationen für *E. coli*, *A. tumefaciens* und *A. thaliana* sind in den jeweiligen Spalten aufgeführt.

Antibiotikum	C_{Stock}	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. thaliana</i>
Cefotaxim	250 mg/ml			500 mg/l
DL-Phosphinothricin (PPT)	20 mg/ml			6 mg/l
Rifampicin	100 mg/ml		100 mg/l	
Spectinomycin	100 mg/ml	100 mg/l	100 mg/l	

2.1.6 Enzyme

Polymerasen

- DreamTaq DNA Polymerase (5 U/ μ l, 10x Amplifikationspuffer, Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot)
- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μ l 5x-Amplifikationspuffer HF & GC, Finnzymes, Vantaa, Finnland)
- KAPAHiFi Polymerase (1 U/ μ l, 5 x Amplifikationspuffer Fidelity & GC, PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen)

Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

- *AbaI*, *PacI*

Andere Enzyme

- DNase I RNase-frei mit RDD-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden)
- Ribonuklease A (RNase A, SERVA Electrophoresis, Heidelberg)

2.1.7 Kits

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim)
- In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, Mountain View, USA)
- peqGold Plasmid Miniprep Kit I (C-Linie, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Qubit dsDNA Broad Range Assay Kit (Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- Qubit RNA Broad Range Assay Kit (Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt)

- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, St. Leon-Rot)
- RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

2.1.8 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers GmbH (Ulm), Invitrogen Life Technologies (Darmstadt) und Metabion International (Martinsried) bezogen und sind im Anhang mit den jeweiligen Sequenzen angegeben (Tabelle 8.19; Tabelle 8.20).

2.1.9 Organismen

Agrobacterium tumefaciens

- Stamm GV3101::pMP90

Dieser Stamm wurde zur Agrobakterien-vermittelten Transformation von *A. thaliana* verwendet. Er trägt eine chromosomal kodierte Rifampicin-Resistenz und ein Ti-Plasmid vermittelte Gentamycin-Resistenz.

Escherichia coli

- Stamm NEB5 α (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

Dieser Stamm wurde zur Vermehrung von Plasmiden verwendet.

Genotyp: *fbuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

Arabidopsis thaliana

- Ökotyp: Columbia (Col-0)
- Reporterlinien: IC9 (Molinier *et al.*, 2004)
- T-DNA Insertionsmutanten: Die in dieser Arbeit verwendeten T-DNA Insertionsmutanten (Col-0 Ökotyp) stammen aus den Kollektionen von SALK (Alonso *et al.*, 2003) beziehungsweise GABI-Kat (Rosso *et al.*, 2003) und sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten T-DNA insertionsmutanten. Angegeben sind jeweils die Bezeichnung der Mutante, der Locus des Gens, ihre Herkunft und die Arbeit, in der die Linie erstmals grundlegend charakterisiert wurde.

Linie	Genlocus	Quelle	Charakterisierung
<i>fancm-1</i>	At1g35530	SALK_069784	Knoll <i>et al.</i> , 2012
<i>mus81-1</i>	At4g30870	GABI_113F11	Hartung <i>et al.</i> , 2006
<i>recq4A-4</i>	At1g10930	GABI_203C07	Hartung <i>et al.</i> , 2007
<i>rtel1-1</i>	At1g79950	SALK_113285	Knoll, 2011
<i>srs2-2</i>	At4g25120	SALK_039766	Knoll, 2011
<i>tert</i>	At5g16850	Fitzgerald <i>et al.</i> , 1999	Fitzgerald <i>et al.</i> , 1999

2.1.10 Plasmide

Zur Klonierung des vollständigen *AtRTEL1*-Gens wurde das Plasmid pSBO-2 verwendet (Abbildung 2.1). Bei diesem Plasmid handelt es sich um einen binären Vektor, der auf pPZP201 basiert (Hajdukiewicz *et al.*, 1994). Er trägt Sequenzen, die die Vermehrung sowohl in Zellen von *E. coli* als auch von *A. tumefaciens* ermöglichen. Zudem befindet sich eine Multiple Cloning Site (MCS) innerhalb von Bordersequenzen, die für den Transformationsmechanismus von *A. tumefaciens* erforderlich sind. In pSBO-2 wurde die ursprüngliche MCS von 8 auf 17 Restriktionsschnittstellen erweitert. Des Weiteren trägt das Plasmid ein *Bar*-Resistenzgen unter Kontrolle des 35S Promotors und 35S Terminators, welches eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum DL-Phosphinothricin (PPT) vermittelt und zur Pflanzenselektion diente (Abbildung 2.1; Bonnet, 2009).

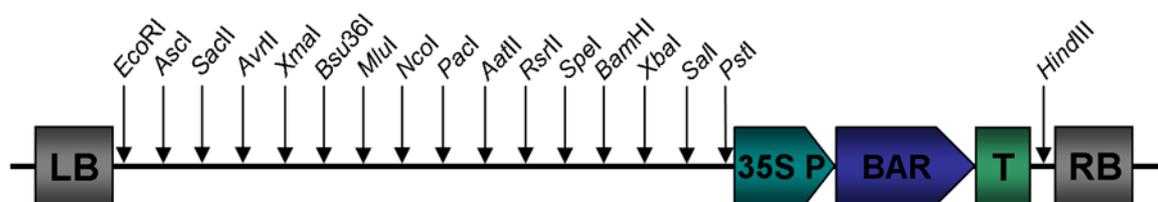


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung von pSBO-2. T-DNA von pSBO-2 mit 17 Restriktionsschnittstellen. Das Rückgrat entspricht dem von pPZP201 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994). **BAR:** Bar-Resistenzgen, **35S P:** 35S Promotor, **T:** 35S Terminator, **LB:** left border, **RB:** right border.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Plasmidpräparation aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des peqGold Plasmid Miniprep Kits (PeqLab) aus *E. coli* isoliert. Hierzu wurde zunächst eine Übernachtskultur mit einer Kolonie beimpft (5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum). Alle weiteren Schritte erfolgten nach Hersteller-Angaben. Zur Elution wurden 50 µl ddH₂O verwendet.

Schnelle DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Die DNA, die durch diese Präparation isoliert wurde, eignete sich zur Genotypisierung der Pflanzen.

Von einer Pflanze wurde ein kleines Blatt für die DNA-Präparation abgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Blattmaterial wurde mit Hilfe eines Kunststoff-Pistills gemörsert und mit 500 µl Shorty-Extraktionspuffer versetzt. Die Blattbestandteile wurden für 5 min bei 17000 g abzentrifugiert. Anschließend wurden 350 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 350 µl Isopropanol vorgelegt waren, und durch Invertieren gemischt. Die DNA wurde anschließend für 10 min bei 19500 g präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer gelöst.

Quantitative DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Genomische DNA für Southern Blots wurde mittels folgender Methode isoliert: Das gesamte Pflanzenmaterial einer fünf Wochen alten Pflanze wurde in einem vorgekühlten Porzellanmörser mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert, in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml Isolierungspuffer versetzt und gemischt. Nach 1 h Inkubation bei 65 °C im Wasserbad wurde die Suspension in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 5 ml Chloroform versetzt. Nach Zentrifugation (15 min, 4 °C, 2500 g) wurde die wässrige, DNA-haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl RNase A die RNA für 20 min bei Raumtemperatur verdaut. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 5 ml eiskaltem Isopropanol und durch Zentrifugation präzipitiert (10 min, 4 °C, 2500 g). Das Pellet wurde mit 2 ml 70 % unvergälltem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde die DNA in 225 µl TE-Puffer gelöst.

RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial

Für Genexpressions-Analysen der T-DNA Insertionsmutanten musste zunächst die RNA aus den entsprechenden Pflanzenlinien isoliert werden. Dazu wurden circa 100 mg Blattmaterial von zwei Wochen alten Keimlingen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Extraktion wurde mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierfür wurde der für die Extraktion eingesetzte RLT-Puffer vor Verwendung mit 10 µl Thioglycerin pro ml Puffer versetzt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Hersteller-Angaben. Der optionale DNA-Verdau mit DNaseI wurde immer durchgeführt.

2.2.1.2 cDNA-Synthese

Die extrahierte Gesamt-RNA (vgl. Abschnitt 2.2.1.1) wurde mit Hilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits (Fisher Scientific Biosciences) in cDNA umgeschrieben. Für jede Synthese wurden 5 µg der Gesamt-RNA eingesetzt (Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Qubit RNA Broad Range). Alle weiteren Schritte erfolgten nach Hersteller-Angaben. Als Primer wurde ein oligo(dT)₁₈ Oligonukleotid aus dem Kit verwendet. Anschließend wurde der 20 µl Reaktionsansatz mit TE-Puffer auf 200 µl aufgefüllt.

2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Herstellen von Genfragmenten zur Klonierung, zur Genotypisierung von Pflanzen und zum Nachweis von Transformationen wurde die PCR eingesetzt.

Abhängig von der Fragestellung wurde die entsprechende Polymerase eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen wurden nach Hersteller-Angaben festgelegt. Zur Genotypisierung wurde ein Gesamtvolumen von 25 µl eingesetzt, zur Amplifikation von Klonierungsfragmenten ein Gesamtvolumen von 50 µl. Die Schmelztemperatur (T_m) für die jeweils eingesetzten Primer, wurde nach folgender Formel berechnet: $T_m [^{\circ}\text{C}] = 4^{\circ}\text{C} \cdot (C + G) + 2^{\circ}\text{C} \cdot (A + T)$.

PCR-basierte Genotypisierung

Bei der PCR-basierten Genotypisierung wurde mit zwei Primerkombinationen untersucht, ob es sich bei den Insertionsmutanten um homozygote Mutanten bezüglich des Gens handelte. Eine Primerkombination beinhaltete einen Gen-spezifischen und einen T-DNA-spezifischen Primer. Nur wenn die T-DNA ins Gen integriert war, konnte die DNA amplifiziert werden. Die andere Primerkombination beinhaltete zwei Gen-spezifische Primer, die vor und hinter der T-DNA Insertion binden. Eine Amplifikation des Gens war nur möglich, wenn keine T-DNA Insertion vorhanden war, da nur dann die Elongationszeit ausreichte. Bei einer homozygoten T-DNA

Insertionsmutante ergab nur die erste PCR, zum Nachweis der T-DNA Insertion, ein PCR-Produkt. Dagegen ergaben bei einer heterozygoten T-DNA Insertionsmutante beide PCRs ein Produkt. Ergab nur die PCR mit den Gen-spezifischen Primern ein Produkt, so handelte es sich um den Wildtyp (Abbildung 2.2).

Klonierungs-PCR

Da bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen der Erhalt der Sequenzinformation besonders wichtig ist, wurden für diese PCRs DNA-Polymerasen verwendet, die über eine Korrekturlese-Funktion verfügten (0,4 U Phusion High-Fidelity bzw. 1 U KAPAHifi pro Reaktionsansatz).

Kolonie-PCR

Zur Kontrolle, ob ein in *E. coli* transformiertes Plasmid das gewünschte DNA-Fragment trägt, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurden ein Insert- und ein Plasmid-spezifischer Primer eingesetzt. Als Matrize diente die DNA der auf entsprechendem Selektionsmedium gewachsenen *E. coli* Kolonien. Für die Amplifikation wurde die DreamTaq DNA Polymerase verwendet.

Quantitative Real-Time PCR

Für Expressionsanalysen von Genen in *A. thaliana* wurden quantitative Real-Time PCRs durchgeführt. Als Matrize diente cDNA (vgl. Abschnitt 2.2.1.2). Die Primerkombinationen wurden so gewählt, dass Produktgrößen von ca. 100-300 bp entstanden. Für einen 10 µl Reaktionsansatz wurden 5 µl LightCycler SYBR Green Mix, je 0,075 µl Primer (50 µM), 2,35 µl ddH₂O und 2,5 µl cDNA eingesetzt. Alle Proben wurden als Triplikate angesetzt. Nach einer initialen Aktivierung der Polymerase und Denaturierung der DNA für 5 min bei 95 °C folgten 50 Zyklen zur Amplifikation (10 s 95 °C, 10 s 56 °C, 20 s 72 °C) und im Anschluss die Erstellung einer Schmelzkurve der DNA-Produkte. Als Referenzgen diente *ACTIN2* (At3g18780), welches bei der Auswertung zur Normalisierung verwendet wurde. Alle Expressionsanalysen erfolgten in drei unabhängigen Experimenten im LightCycler 480 und mit der Software des Herstellers.



Abbildung 2.2: Prinzip der PCR-basierten Genotypisierung. Mit verschiedenen Primerkombinationen kann untersucht werden, ob die T-DNA in das Gen integriert ist. Mit einem Gen-spezifischen Primer (P1) und einem T-DNA-spezifischen Primer (P2) erfolgt der Nachweis der integrierten T-DNA. Bei der PCR mit zwei Gen-spezifischen Primern (P1 und P3) reicht die Elongationszeit nur aus, wenn keine T-DNA Insertion vorhanden ist.

2.2.1.4 In-Fusion-Klonierung

Bei der In-Fusion-Klonierung werden Inserts mittels homologer Rekombination in den Vektor kloniert. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase aus einem Virus der Familie der *Poxviridae* mit einer 3'-5' Exonuklease-Aktivität (Hamilton *et al.*, 2007) werden DNA-Moleküle mit kurzen Homologiebereichen an ihren Enden mit den komplementären Enden anderer DNA-Moleküle zusammengefügt. Die homologen Bereiche zwischen Insert und Vektor wurden durch Primer mit Adaptersequenz angefügt, welche mittels des Online-Tools von Clontech erstellt wurden. Die Zusammensetzung und Durchführung der In-Fusion-Reaktion erfolgte nach Hersteller-Angaben.

2.2.1.5 Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung der Klonierung wurden die Plasmide sequenziert. Das Plasmid wurde zunächst mittels Plasmidpräparation aus transformierten *E. coli* Zellen isoliert (siehe Abschnitt 2.2.1.1) und zusammen mit den entsprechenden Primern zur Sequenzierung der Firma GATC Biotech geschickt. Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die Sequenzdaten von der Webseite der Firma heruntergeladen und analysiert.

2.2.1.6 Aufreinigung von DNA

Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die zur Klonierung in Plasmide verwendet werden sollten, wurden mit Hilfe des High Pure PCR Product Kits aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde nach Hersteller-Angaben mit folgenden Abweichungen durchgeführt: Jeder Zentrifugationsschritt war 1 min lang und nach dem zweiten Waschschrift wurde einmal unter gleichen Bedingungen das Reaktionsgefäß trocken zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte mit ddH₂O. Zur besseren Elution wurde vor der Zentrifugation mindestens eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert.

Aufreinigung von hochkonzentrierten DNA-Lösungen

Hochkonzentrierte DNA-Lösungen, wie beispielsweise von einem Verdauansatz für Southern Blots (vgl. Abschnitt 2.2.1.7), wurden durch DNA-Präzipitation aufgereinigt. 100 µl des Verdauansatzes wurden mit 200 µl eiskaltem, absoluten Ethanol und 10 µl kaltem 3 M Na-Acetat (pH 5,2) versetzt und die DNA bei -20 °C für 30 min präzipitiert und anschließend zentrifugiert (15 min, 4 °C, 21000 g). Das Pellet wurde mit 70 % reinem Ethanol gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 4 °C, 21000 g) bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 25 µl ddH₂O gelöst.

2.2.1.7 Southern Blot

Vorbereitung der DNA

Der Southern Blot diente zur Untersuchung der terminalen Restriktions-Fragmente (*terminal restriction fragments*, TRFs) in *rtel1-1* und *tert*. Hierfür wurde von den entsprechenden Linien genomische DNA isoliert (vgl. Abschnitt 2.2.1.1). Beim anschließenden Restriktionsverdau wurde jeweils 1 µg DNA mit *AluI* in einem Gesamtvolumen von 100 µl verdaut (37 °C, über Nacht). Am Folgetag wurde die geschnittene DNA präzipitiert und in 25 µl ddH₂O gelöst (vgl. Abschnitt 2.2.1.6).

Übertragung der DNA auf eine Membran

Die gesamte, geschnittene und gereinigte DNA wurde auf ein 1 % TAE-Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (ca. 2 V/cm, 16 h). Im Anschluss wurde das Gel aufeinanderfolgend für jeweils 30 min in Denaturierungspuffer, Neutralisierungspuffer und 20x SSC-Puffer inkubiert. Danach wurde die DNA mittels S&S TurboBlotter auf eine neutrale Nylon-Transfermembran übertragen. Der Aufbau der S&S TurboBlotter-Apparatur sowie das anschließende Blotten erfolgten nach Hersteller-Angaben für 3 h. Anschließend wurde die Nylonmembran für 5 min in 2x SSC-Puffer gewaschen, zwischen zwei Glasscheiben gelegt und zur irreversiblen Fixierung der DNA an die Membran für 2 h bei 80 °C inkubiert. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran bei 4 °C gelagert.

Sondenmarkierung

Zum Nachweis der TRFs diente ein 5'-markiertes (T₃AG₃)₄-Oligonukleotid als Sonde. Zur radioaktiven Markierung der DNA-Sonde wurde ein Reaktionsansatz aus 1 µl des Oligonukleotids (10 µM), 2 µl T4 Polynukleotid Kinase Puffer (10x), 1 µl T4 Polynukleotid Kinase und [γ³²P]-ATP (10 pmol; >6000 Ci/mmol spezifische Aktivität) mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für 10 min bei 65 °C abgestoppt und mit 800 µl TE-Puffer versetzt. Für die Hybridisierung wurde der gesamte Ansatz verwendet.

Hybridisierung

Vor Hybridisierung der DNA mit der radioaktiv markierten Sonde wurde die Membran prähybridisiert. Hierfür wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre gelegt, mit 50 ml Hybridisierungspuffer benetzt und für 2 h bei 55 °C im Hybridisierungsofen rotierend inkubiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde zugegeben und 18 h bei 55 °C im Ofen rotierend hybridisiert. Danach wurde der Hybridisierungspuffer entfernt und die Membran

zweimal mit 300 ml Waschlösung I (jeweils 5 min bei 55 °C) und zweimal mit 300 ml Waschlösung II (jeweils 15 min bei 55 °C) gewaschen.

Detektion

Die gewaschene Membran wurde, in Folie verpackt, auf eine strahlungssensitive *Imaging Plate* gelegt. Während der Exposition wurden Membran und *Imaging Plate* in einer BAS-Kassette aufbewahrt. Die erste Detektion erfolgte ca. 4 h später mittels *CR 35 Bio High Speed Image Plate Scanner*. Für längere Expositionen wurde die *Imaging Plate* nach Detektion gelöscht und erneut auf die Membran gelegt.

2.2.2 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

2.2.2.1 Transformation des *E. coli* Stamms NEB α

Im Anschluss an eine In-Fusion-Reaktion (vgl. Abschnitt 2.2.1.4) wurden Plasmide zur Vermehrung in *E. coli*-Zellen eingebracht. Hierzu wurden chemokompetente NEB5 α Zellen eingesetzt. Die Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut (Lagerung bei -80 °C) und anschließend 100 μ l Bakterienzellen mit 5 μ l des Reaktionsansatzes vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 s und einer Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 800 μ l flüssigem LB-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C geschüttelt (650 UPM).

2.2.2.2 Transformation des *A. tumefaciens* Stamms GV3101::pMP90

Nachdem die korrekte Klonierung eines Konstruktes in *E. coli* Zellen nachgewiesen wurde, folgte im nächsten Schritt die Transformation von *Agrobacterium* Zellen mit dem Vektor. Hierzu wurden je 100 μ l elektrokompente Zellen auf Eis aufgetaut, mit je 1 μ l präparierter Plasmid-DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte im Elektroporator (2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω , 5 ms). Anschließend wurden die Zellen mit 500 μ l YEB-Medium versetzt und 1 h bei 28 °C geschüttelt (650 UPM). Danach wurden jeweils 100 μ l eines Transformationsansatzes auf YEB-Platten mit den benötigten Selektions-Antibiotika (Rifampicin, Gentamycin und Spectinomycin) ausplattiert und 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

2.2.2.3 Identifikation und Analyse transformierter Klone

Zur Identifikation positiv transformierter Klone wurden 100 µl Bakterienzellen aus dem Transformationsansatz auf LB-Platten mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Wahl des Antibiotikums richtete sich nach der jeweiligen durch das verwendete Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz. Nur Bakterienzellen, die das Plasmid aufgenommen haben, weisen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum auf und sind zum Wachstum befähigt.

2.2.3 Pflanzenarbeiten

2.2.3.1 Pflanzenanzucht

S1-Gewächshaus

Pflanzen, die zur Samengewinnung, Kreuzung, Transformation oder Blüten- und Schotenuntersuchung benötigt wurden, wurden im Gewächshaus angezogen. Als Substrat wurde ein 1:1-Gemisch aus Floraton3 (Floragard) und Vermiculit (2-3 mm, Deutsche Vermiculite, Dämmstoff GmbH) verwendet. Der Tag/Nacht-Rhythmus betrug 16 h Licht/8 h Dunkelheit bei 22 °C.

Anzuchtschrank

Um konstante Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurden Pflanzen für Rekombinationstests und Sensitivitätstests im Anzuchtschrank angezogen. Darin wurden die Pflanzen täglich 16 h bei 22 °C belichtet, gefolgt von einer Dunkelphase von 8 h bei 20 °C.

Anzuchtraum

Pflanzen für Segregationsanalysen wurden im Anzuchtraum angezogen. Hier setzte sich der Tag/Nacht-Rhythmus aus 16 h Licht/8 h Dunkelheit bei 24 °C zusammen.

2.2.3.2 Kreuzungen

Zur Kombination genetischer Merkmale einzelner T-DNA Insertionsmutanten wurden die Pflanzenlinien miteinander gekreuzt. Zunächst wurden alle Schoten und offenen Blüten der Mutterpflanze entfernt. Von noch geschlossenen Blütenknospen wurden Kelch- und Blütenblätter sowie Antheren entfernt, um den Fruchtknoten freizupräparieren. Zur Befruchtung dienten reife Antheren der Vaterpflanze, deren Pollenkörner auf die Narbe der Mutterpflanze

übertragen wurden. Frische Triebe und Blüten der gekreuzten Pflanzen wurden bis zur Samenreife regelmäßig zurückgeschnitten.

2.2.3.3 Pollenvitalitätstest

Eine verringerte Fertilität von *Arabidopsis*-Mutanten kann auf Defekten in zwei verschiedenen Prozessen in der Gametogenese basieren: Zum einen kann der Ausfall des Genprodukts in der Mutante zu einer fehlerhaften Meiose und dadurch zum Verlust der Mikro- beziehungsweise Makrospore führen. Zum anderen kann der Ausfall einen negativen Einfluss auf die anschließende Gametophytenentwicklung haben. In der männlichen Gametogenese würde dies zu einer erhöhten Anzahl nicht lebensfähiger Pollen führen.

Zur Untersuchung der Pollenvitalität wurden ganze Antheren mittels Alexanderfärbung gefärbt (Alexander, 1969). Ganze Blütenknospen wurden für 1 h in Carnoy-Lösung fixiert. Nach einem Waschschrift mit ddH₂O wurden Antheren des Stadiums 12-13 (Smyth *et al.*, 1990) freipräpariert, auf Objektträger überführt und mit Alexander-Färbelösung gefärbt. Die Präparate wurden mittels eines Bunsenbrenners erhitzt und über Nacht bei 60 °C inkubiert. Die Antheren wurden anschließend am Binokular untersucht. Es wurde zwischen vitalen Pollen in rot bis violett und abgestorbenen Pollen in grün bis blau unterschieden. Des Weiteren wurde der Flächeninhalt der Antheren mittels des Programms ImageJ berechnet.

2.2.3.4 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis*-Samen

Die benötigte Menge Samen wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße abgefüllt. Die Samen wurden in 300 µl 70 % Ethanol für eine Minute inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 500 µl sterilem ddH₂O folgte eine achtminütige Inkubation der Samen in 500 µl 4 % Natriumhypochlorit (frisch hergestellt aus einer 12 % Lösung). Anschließend wurden die Samen unter sterilen Bedingungen dreimal mit 500 µl ddH₂O gewaschen. Zur Stratifikation wurden die Samen nach Zugabe von 1 ml 0,1 % Agarose-Lösung über Nacht bei 4 °C gelagert. Auf jeden der beschriebenen Schritte (Ethanol, Natriumhypochlorit, Waschen) folgte eine Durchmischung der Samen und ein anschließendes Abzentrifugieren für 15 s bei 1075 g, sodass der Überstand abgenommen werden konnte.

2.2.3.5 Sensitivitätstests

Zur Bestimmung der Sensitivität von T-DNA Insertionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp wurde deren Wachstum nach Behandlung mit verschiedenen Genotoxinen untersucht.

Das am Vortag oberflächensterilisierte Saatgut wurde auf festem GM-Medium ausgebracht. Nach einer Woche Anzucht im Percival Inkubationsschrank wurden die Pflanzen zu je 10 Stück in 6-Well-Platten mit je 4 ml flüssigem GM-Medium pro Well überführt (Kontrollansätze ohne Genotoxine mit 5 ml GM pro Well). Am Folgetag wurde jeweils 1 ml Genotoxin-Lösung zugegeben, deren Konzentration zuvor so eingestellt wurde, dass sich folgende Endkonzentrationen ergaben (siehe Tabelle 2.3). Drei Wochen nach Aussaat wurden die zehn Keimlinge eines Ansatzes mit Küchenpapier abgetupft und gewogen. Zur Auswertung der Daten wurde zunächst der Mittelwert aus den Gewichten der beiden unbehandelten Kontrollen gebildet. Dieser Mittelwert diente als Grundlage für alle weiteren Berechnungen. Indem der Mittelwert als 100% gesetzt wurde, konnten alle Werte von mit Genotoxin behandelten Proben als prozentualer Anteil des Gewichts der unbehandelten Proben dargestellt werden. Aus mindestens drei unabhängigen Versuchen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung ermittelt und in einem Säulendiagramm dargestellt.

2.2.3.6 Rekombinationstests

Mittels Rekombinationstests wurde die Rekombinationsrate in den T-DNA Insertionsmutanten bestimmt und mit der des Wildtyps verglichen.

Grundlage für diesen Versuch ist die Reporterlinie IC9 (Molinier *et al.*, 2004). Diese Linie enthält zwei nicht funktionelle, sich überlappende Fragmente des für die β -Glucuronidase kodierenden Gens *GUS*. Durch homologe Rekombination kann das Gen restauriert werden. Diese Rekombinationsereignisse sind nach histochemischer Färbung mit X-GlcA als blaue Sektoren quantifizierbar.

Am Vortag oberflächensterilisierte Samen wurden auf festem GM-Medium ausgebracht. Nach einer Woche Anzucht im Percival Inkubationsschrank wurden die Keimlinge in zweigeteilte Petrischalen mit jeweils 9 ml GM-Medium überführt (jeweils 40 Pflanzen pro Hälfte). Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 1 ml Bleomycin-Lösung bzw. 1 ml *cis*-Platin-Lösung zur Induktion von Doppelstrangbrüchen, sodass die Endkonzentration 5 μ g/ml (Bleomycin) bzw. 3 μ M (*cis*-Platin) pro Halbschale betrug. Bei uninduzierten Pflanzen betrug das GM-Volumen zu Anfang 10 ml. Nach weiteren 6 Tagen Anzucht im Percival wurden die Pflanzen in 50 ml

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Konzentrationen der verschiedenen Genotoxine. Die Konzentrationen wurden für die Sensitivitätstests in Flüssigmedium verwendet.

	Konzentration				Einheit
<i>cis</i> -Pt	5	7,5	8,5	10	μ M
MMC	5	10	15	20	μ g/ml

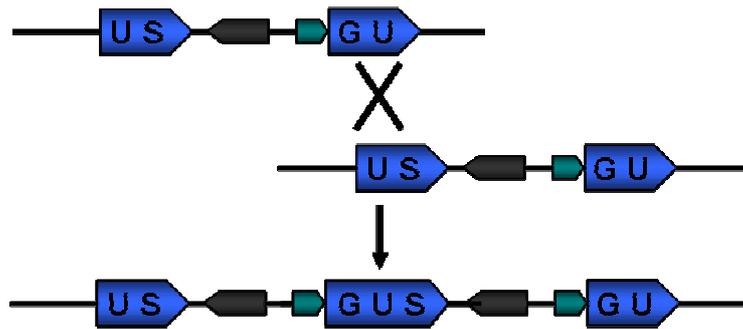


Abbildung 2.3: Rekombinationskonstrukt zur Untersuchung interchromosomaler HR. Reporterlinie IC9 mit zwei inaktiven Fragmenten (GU, US) des β -Glucuronidasegens (*GUS*). Beide Fragmente enthalten eine identische Sequenz (U, 1213 bp). Durch HR kann das Gen restauriert werden. Grüner Pfeil: Promoter des Cauliflower-Mosaikvirus; Dunkelgrauer Pfeil: Hygromycin-Resistenzgen (Molinier *et al.*, 2004)

Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 7 ml X-GlcA-Färbelösung wurden die Pflanzen zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen und zur Extraktion der Blattfarbstoffe mit 70 % vergälltem Ethanol für einen Tag bei 60 °C inkubiert.

Mit Hilfe eines Binokulars wurde die Anzahl der blauen Sektoren pro Pflanze gezählt und der Durchschnitt pro Ansatz berechnet. Von mindestens drei unabhängigen Versuchen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und in einem Säulendiagramm dargestellt.

2.2.3.7 Messung der Wurzellänge

Um die Wurzellänge zu messen, wurde das am Vortag oberflächensterilisierte Saatgut auf eckigen Petrischalen (mit GM und 1 % Agar) ausgebracht. Die Platten wurden anschließend mit Parafilm umwickelt und hochkant im Percival Inkubationsschrank inkubiert. Die Messung erfolgte sieben Tage nach Anzucht mit Hilfe des Programms SmartRoot (Lobet *et al.*, 2011).

2.2.3.8 Zelltod-Analyse in Wurzeln

Zur Untersuchung der Wurzelentwicklung und des Zelltods wurden die Wurzeln mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Da dieser Farbstoff die Membran von lebenden Zellen nicht durchdringt, werden nur tote Zellen gefärbt. Dies ermöglicht eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen.

Das am Vortag oberflächensterilisierte Saatgut wurde wie in Abschnitt 2.2.3.7 beschrieben ausgebracht und angezogen. Nach vier Tagen Anzucht im Percival Inkubationsschrank wurden die Keimlinge mit 5 ml flüssigem GM in 6-Well Platten überführt. Zur Analyse der Zellteilung nach Genotoxin-Behandlung wurde das GM zuvor mit *cis*-Platin versetzt, sodass die

Endkonzentration 35 μM betrug. Nach 18 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Pflanzen 4-mal mit flüssigem GM gewaschen. Anschließend wurden die Wurzeln zusammen mit 100 μl PI auf Objektträger überführt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des LSM 700 Laser Scanning Mikroskops.

2.2.3.9 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Zur Transformation von *A. thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens* wurde zunächst eine Vorkultur (25 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika) mit einer Agrobakterien-Kolonie beimpft und über Nacht bei 28 °C und 200 UPM inkubiert. Diese Zellsuspension diente als Inokulum für die flüssige Hauptkultur: Zu 400 ml YEB-Medium wurden erneut die nötigen Antibiotika und 500 μl der Vorkultur gegeben; die Inkubation erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Vorkultur.

Am Folgetag wurden die Pflanzen transformiert: Zunächst wurden geöffnete Blüten und Schoten der zu transformierenden Pflanzen entfernt. Im frisch angesetzten Infiltrationsmedium wurden die abzentrifugierten Agrobakterien (15 Minuten, 20 °C, 4200 g) resuspendiert. Nach Zugabe von je 400 μl Silwet Gold wurden die Pflanzen circa 30 s lang bis zu den Rosettenblättern über Kopf in die Bakteriensuspension getaucht, die dabei ständig gerührt wurde. Die behandelten Pflanzen wurden in befeuchtete dunkle Kisten gelegt und nach 24 h zur Entfernung der Agrobakterien mit Leitungswasser abgesprüht. Die Pflanzen wurden bis zur Samenreife im Gewächshaus angezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Die DNA-Helikase RTEL1 in *A. thaliana*

Die HR ist ein essentieller Prozess. Sie ist sowohl wichtig für die Reparatur von DSBs und für die Wiederaufnahme von stehengebliebenen Replikationsgabeln als auch für die genetische Neukombination in der Meiose. Für die Genomstabilität ist es jedoch besonders wichtig, dass die HR streng reguliert wird. In *C. elegans* konnte bereits gezeigt werden, dass RTEL1 während der HR eine wichtige Rolle als Antirekombinase übernimmt. Mutationen in *RTEL1* resultieren in einem ähnlichen Phänotyp wie Mutationen in *SRS2* aus Hefe. Daher wurde RTEL1 als funktionelles Analogon von SRS2 postuliert (Barber *et al.*, 2008). Sowohl in Mäusen als auch in Menschen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass RTEL1 wichtig für die Genomintegrität ist. In diesen Organismen übernimmt RTEL1 eine wichtige Funktion beim Telomererhalt (Vannier *et al.*, 2012; Ballew *et al.*, 2013b). In *A. thaliana* sind sowohl SRS2 als auch RTEL1 konserviert. *In vivo* konnte für *AtSRS2* bisher keine Funktion nachgewiesen werden (Knoll, 2011). In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Funktionen RTEL1 in der HR, der DNA-Reparatur und an den Telomeren in *A. thaliana* hat.

3.1.1 Charakterisierung einer T-DNA Insertionsmutante von *AtRTEL1*

Das Gen von *AtRTEL1* liegt auf dem ersten Chromosom (At1g79950) und hat vom Start- bis Stopcodon eine Länge von 5958 bp. Es besitzt 21 Exons und 20 Introns. Das RTEL1 Protein ist 1040 Aminosäuren lang und besitzt eine DEAD-Helikasedomäne sowie eine C-terminale Helikasedomäne. Zur Untersuchung der Funktion von RTEL1 in *A. thaliana* diente die T-DNA Insertionslinie *rtel1-1* aus der SALK-Kollektion (SALK_113285). Sequenzanalysen konnten

zeigen, dass es sich bei der T-DNA Insertion um eine Mehrfachinsertion in Exon 7 handelt. Die T-DNA weist in beiden zum Gen orientierten *left borders* Deletionen von 73 bp beziehungsweise 97 bp auf. Aufgrund der Insertion kam es in der *RTEL1* Wildtypsequenz ebenfalls zu einer Deletion von 20 bp in Exon 7. Neben den Deletionen in der T-DNA und im Gen konnten außerdem zusätzliche Insertionen identifiziert werden, die weder der T-DNA Sequenz noch dem *RTEL1* Gen entstammen. Diese zusätzlichen Insertionen von 24 beziehungsweise 18 bp flankieren die mehrfach-integrierte T-DNA (Abbildung 3.1).

3.1.2 Die Eisen-Schwefel-Domäne in RTEL1

Aufgrund der Eisen-Schwefel-Domäne lässt sich die Helikase RTEL1 in eine Untergruppe mit XPD, FANCD1 und CHL1 zusammenfassen. Rudolf *et al.* konnten 2006 mittels Sequenzanalysen von Homologen dieser Helikasefamilie in Eukaryoten und *Archea* eine konservierte Domäne zwischen dem Walker A- und Walker B-Motiv identifizieren. Eines der Hauptmerkmale dieser Domäne sind vier konservierte Cystein-Reste. Sie konnten zeigen, dass dieser Bereich ein Eisen-Schwefel Cluster bildet. In *Archea* ist die Eisen-Schwefel-Domäne von XPD für die

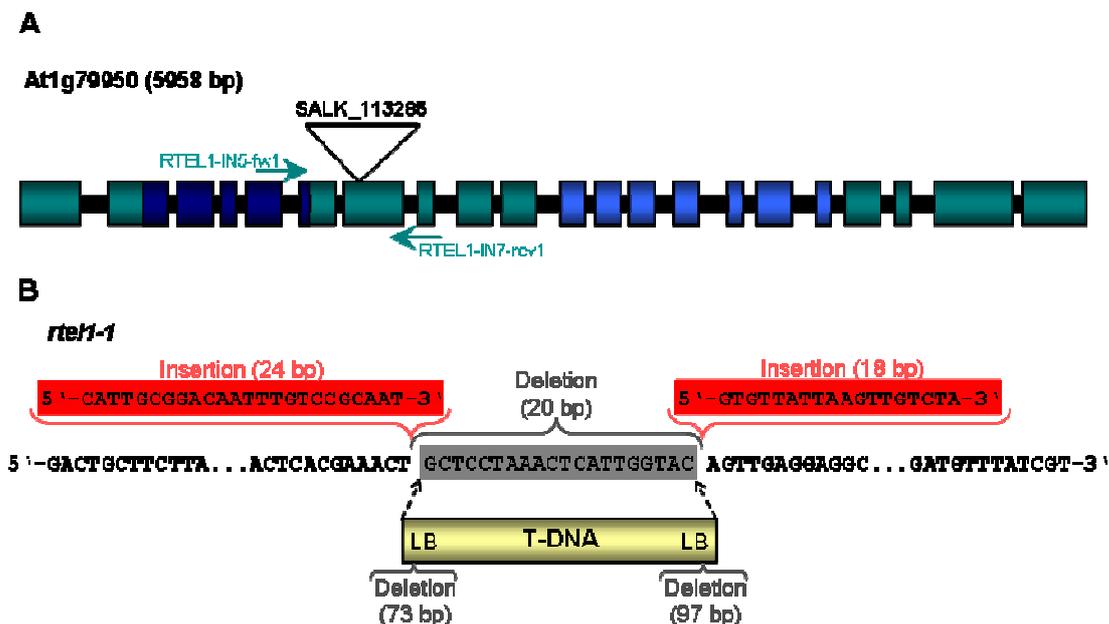


Abbildung 3.1: Genstruktur von AtRTEL1 und die Position der T-DNA Insertion. A) Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *RTEL1* in *A. thaliana* vom Start- bis Stopcodon. Das Gen besteht aus 21 Exons und 20 Introns. Die DEAD-Helikasedomäne (dunkelblau) sowie die C-terminale Helikasedomäne (hellblau) wurden eingezeichnet. Die T-DNA Insertion befindet sich in der Mutantenlinie SALK_113285 (*rte1-1*) in Exon 7. **B)** DNA-Sequenz von *RTEL1* am Insertionsort. Die T-DNA (gelb) ist mehrfach inseriert und weist Deletionen in beiden *left borders* (LB; 73 bp beziehungsweise 97 bp) auf. Am Insertionsort wurden 20 bp deletiert (grau). 5' und 3' der T-DNA wurden 24 bp beziehungsweise 18 bp inseriert (rot).

Helikaseaktivität essentiell. In Hefen verursachen Mutationen in der Eisen-Schwefel-Domäne von RAD3 (XPD-Homolog) eine erhöhte UV-Sensitivität. Im Menschen konnten Mutationen in der Eisen-Schwefel-Domäne von XPD und FANCI ebenfalls mit einem Verlust der Helikaseaktivität und den daraus resultierenden Krankheiten Fanconi Anämie beziehungsweise Trichothiodystrophie in Verbindung gebracht werden (Rudolf *et al.*, 2006). Da die Eisen-Schwefel-Domäne für die vollständige Funktion dieser Helikasen offenbar von besonderer Wichtigkeit ist, wurde untersucht, ob diese Domäne auch in *AtRTEL1* konserviert ist. Dazu wurde der Bereich zwischen den beiden Walker-Motiven von *AtRTEL1* mit den bereits bekannten konservierten Eisen-Schwefel-Domänen dieser Helikasefamilie abgeglichen. Es konnte gezeigt werden, dass in *AtRTEL1* die vier für die Eisen-Schwefel-Domäne charakteristischen Cystein-Reste ebenfalls konserviert sind (Abbildung 3.2).

3.1.3 Expressionsanalysen

Bei T-DNA Insertionsmutanten kann nicht ausgeschlossen werden, dass dennoch Bereiche des betroffenen Gens abgelesen werden. Beispielsweise könnte eine Transkription des Gens vom Startcodon bis zur T-DNA stattfinden. Weiterhin könnte es zu einer Transkription hinter der T-DNA Insertion kommen. Die Expression von *RTEL1* in der *rte1-1* Insertionsmutante wurde mittels quantitativer *real-time* PCR überprüft. Hierzu wurde die RNA aus *rte1-1* und Wildtyp-Pflanzen extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die Analyse erfolgte mit drei verschiedenen

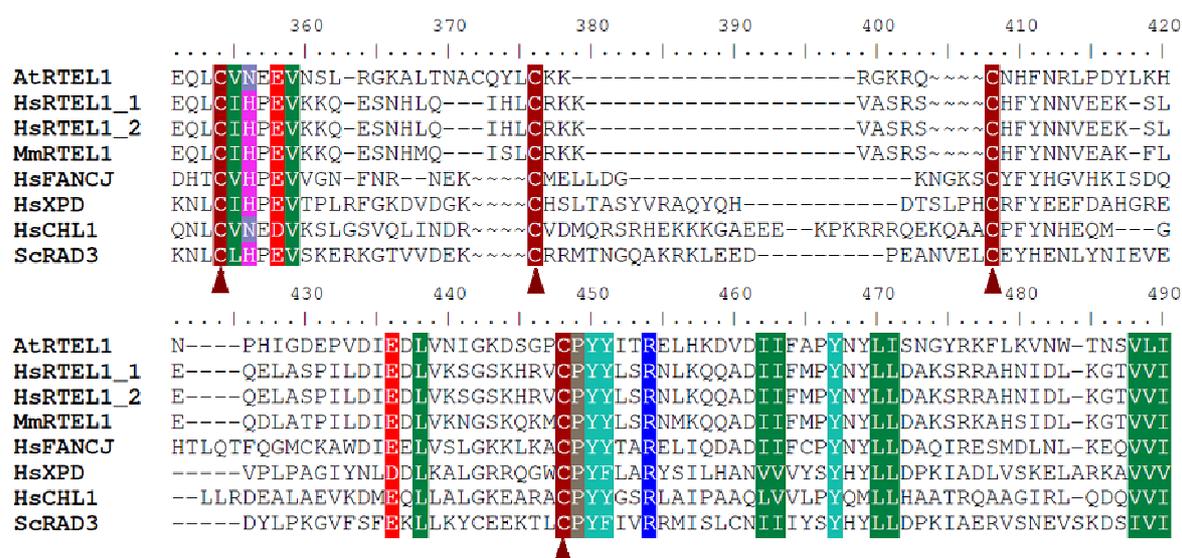


Abbildung 3.2: Sequenzabgleich von *AtRTEL1* mit Helikasen mit bekannter Eisen-Schwefel-Domäne. Der Sequenzbereich zwischen Walker A- und Walker B-Motiv von *AtRTEL1* wurde mit den Homologen von Maus und Mensch sowie weiteren Helikasen mit Eisen-Schwefel-Domäne (*HsFANCI*, *HsXPD*, *HsCHL1*, *ScRAD3*) abgeglichen. *HsRTEL1_1* und *HsRTEL1_2* entsprechen zwei verschiedenen Isoformen. Die vier charakteristischen Cystein-Reste der Eisen-Schwefel-Domäne sind in allen acht abgebildeten Helikasen konserviert (dunkelrot hinterlegt).

Primerkombinationen: 5' der T-DNA, die T-DNA flankierend und 3' der T-DNA. Die Expression des Haushaltsgens *ACTIN2* diente zur Normalisierung. Die Sequenzen der verschiedenen Primer sind im Anhang aufgelistet. 5' der T-DNA war die Expression von *AtRTEL1* in *rtel1-1* etwas niedriger als die Expression im Wildtyp. Mit der Primerkombination, welche die T-DNA flankiert, betrug die Restexpression in der Mutante nur noch 0,77 %. Mit der Primerkombination 3' der T-DNA wurde eine Restexpression von 9,09 % detektiert. Da der vordere Teil des Gens noch unverändert transkribiert wurde, ist die Insertionsmutante *rtel1-1* demnach keine Nullmutante. Da allerdings über die Insertion hinweg kaum eine Expression messbar war, ist anzunehmen dass ein eventuell gebildetes Restprotein keine oder nur eine stark eingeschränkte Funktion hätte (Abbildung 3.3).

3.1.4 Klonierung von Konstrukten zur Komplementation der *rtel1-1* Mutante

Zur Untersuchung der Funktion von *RTEL1* in *A. thaliana* stand nur eine Mutante zur Verfügung. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die T-DNA mehrfach im Genom integriert ist. Es wäre also möglich, dass der beobachtete Phänotyp durch Mutationen in anderen Genen entsteht. Zudem kann eine Translokation der T-DNA nicht ausgeschlossen werden, wodurch der Phänotyp ebenfalls nicht auf ein defektes *RTEL1*-Gen zurückzuführen wäre.

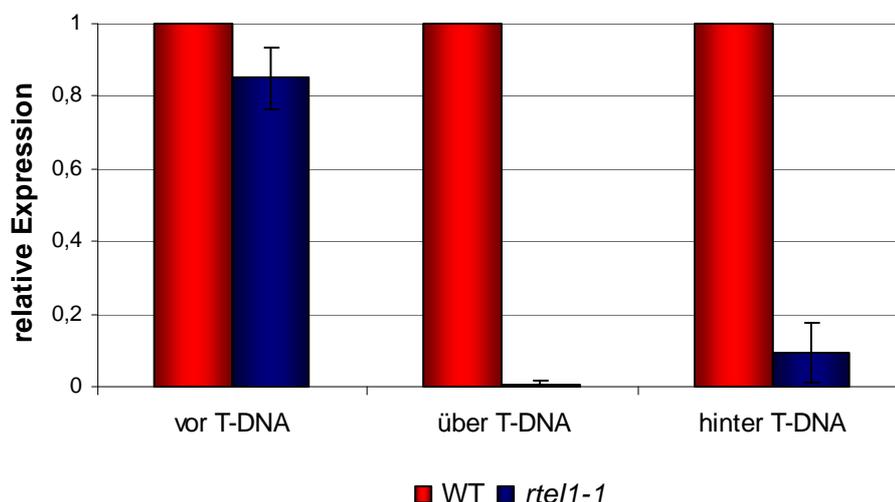


Abbildung 3.3: Expressionsniveau von *AtRTEL1* in der Mutantenlinie *rtel1-1*. Die Genexpression von *RTEL1* wurde mit drei verschiedenen Primerkombinationen in der Mutante *rtel1-1* getestet und in Relation zu der Genexpression von *RTEL1* im Wildtyp (WT) gesetzt. Vor der T-DNA Insertion (vor T-DNA) war das Expressionsniveau in der Mutante vergleichbar mit dem Wildtyp. Mit der T-DNA flankierenden Primerkombination (über T-DNA) und der hinter der T-DNA bindenden Primerkombination (hinter T-DNA) war die Expression stark reduziert (0,77 % und 9,09 %). Zur Normalisierung diente *ACTIN2*.

Weiterhin konnte in Abschnitt 3.1.3 gezeigt werden, dass die Bildung von Restprotein möglich wäre. Auch dieses enorm verkürzte Protein könnte negative Auswirkungen auf die Zelle haben. Um festzustellen, ob die untersuchten Defekte tatsächlich auf die Mutation des *RTEL1*-Gens zurückzuführen waren, wurde eine Komplementationsanalyse durchgeführt. Nur wenn die beobachteten Phänotypen tatsächlich auf ein defektes *RTEL1*-Gen zurückzuführen wären, wäre eine erfolgreiche Komplementation möglich. Für die Komplementationsanalyse wurde das *RTEL1*-Gen mit natürlichem Promotor und Terminator aus genomischer Wildtyp-DNA amplifiziert und mittels In-Fusion-Reaktion in den Vektor pSBO-2 eingefügt (Bonnet, 2009). Anschließend wurde *RTEL1* durch eine Agrobakterien-vermittelte Transformation in die Mutantenlinie *rtel1-1* eingebracht. Zur Kontrolle wurde das Gen ebenfalls in die Wildtypelinie transformiert. Drei homozygot etablierte Linien *rtel1-1::RTEL1* (JR448, JR449, JR450) wurden bei den folgenden Experimenten ebenfalls analysiert. (Abbildung 3.4).

3.1.5 Die Funktion von *AtRTEL1* in der somatischen homologen Rekombination

Ein Grund dafür, dass *RTEL1* als funktionelles Analogon von *SRS2* postuliert wurde (Barber *et al.*, 2008), ist unter anderem die ähnliche Funktion der beiden Helikasen während der HR. Beide Helikasen regulieren die HR negativ, indem sie D-Loop-Rekombinationsintermediate auflösen. In *A. thaliana* sind sowohl *SRS2* als auch *RTEL1* konserviert. *AtSRS2* wurde zuvor bereits ausführlich untersucht. Zwar konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Homolog um eine funktionelle Helikase handelt (Blanck *et al.*, 2009), dennoch konnte keine Funktion *in vivo* nachgewiesen werden (Knoll, 2011). Der Grund könnte eine mögliche redundante Funktion von *RTEL1* und *SRS2* in *A. thaliana* sein.

Um zu untersuchen, ob *RTEL1* in *A. thaliana* ebenfalls eine Funktion als Antirekombinase übernimmt und somit eine unterdrückende Wirkung auf die HR hat, wurde das Reporterkonstrukt IC9 verwendet (Molinier *et al.*, 2004). Durch die Restaurierung eines



Abbildung 3.4: T-DNA Bereich des *RTEL1*-Komplementationsplasmid. Zur Komplementation der Mutantenlinie *rtel1-1* wurde das *RTEL1*-Wildtypkonstrukt kloniert und mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in die Pflanzen eingebracht. Das *RTEL1*-Gen wurde mit natürlichem Promotor (P; weiß) und Terminator (T; weiß) aus genomischer Wildtyp-DNA amplifiziert. DEXDC: DEAD-Helikasedomäne, HELICc: C-terminale Helikasedomäne, BAR: Bar-Resistenzgen, 35S P: 35S Promotor, T (Schwarz): 35S Terminator, LB: *left border*, RB: *right border*.

funktionellen *GUS*-Gens kann die Rekombinationsrate nach histochemischer Färbung anhand blauer Sektoren quantifiziert werden (Abbildung 2.3).

Die Rekombinationsrate von *rtel1-1* war im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht (Abbildung 3.5). Die Komplementationslinien verhielten sich bezüglich der Rekombinationsrate wie der Wildtyp. Es konnte demnach ausgeschlossen werden, dass der abweichende Phänotyp von *rtel1-1* durch Defekte anderer Gene oder durch negative Auswirkungen der T-DNA auf das Genom ausgelöst wurde. Zur Überprüfung der Redundanz von RTEL1 und SRS2 wurde zudem die Rekombinationsrate der *rtel1-1 srs2-2* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp und der beiden Einzelmutanten getestet. Die HR-Rate von *srs2-2* entsprach der vom Wildtyp. Die Doppelmutante verhielt sich wie die *rtel1-1* Einzelmutante. Eine Redundanz konnte demnach ausgeschlossen werden (Abbildung 3.5).

Mit FANCM wurde bereits eine weitere Antirekombinase in *A. thaliana* beschrieben (Knoll *et al.*, 2012). Für die Linie *fancm-1* konnte im Grundzustand eine erhöhte Rekombinationsrate gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. In dieser Arbeit wurde die Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* durch Kreuzung hergestellt und untersucht, um genaueren Aufschluss über die Funktion von RTEL1 in Rekombinations- und Reparaturmechanismen zu erhalten. Die erhöhte

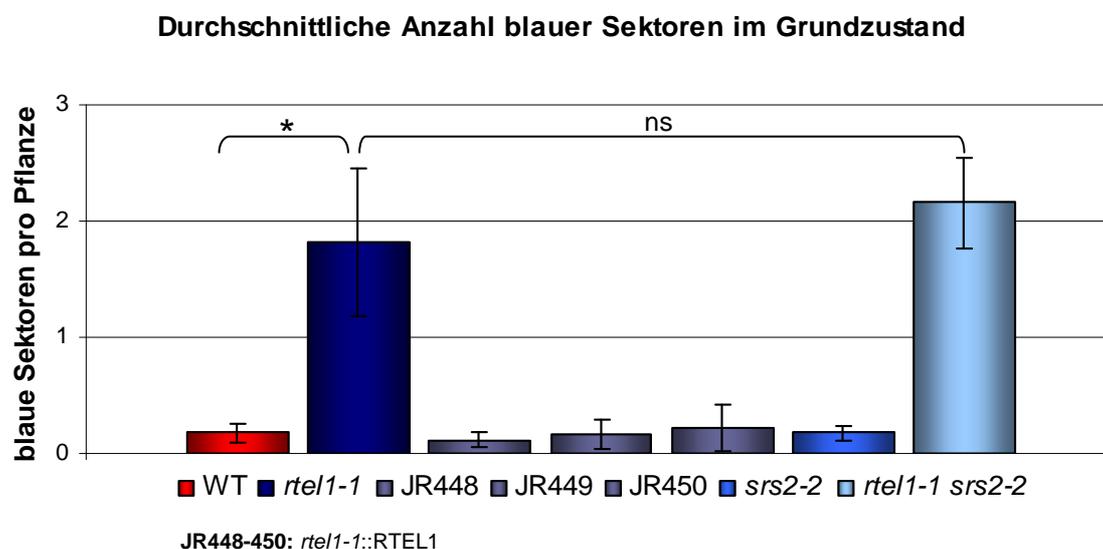


Abbildung 3.5: Rekombinationsrate von *rtel1-1*. Die Rekombinationsrate wurde mit Hilfe des Reporterkonstrukts IC9 bestimmt. Die HR-Rate von *rtel1-1* war im Vergleich zum Wildtyp (WT) signifikant ($p < 0,05$) erhöht und wurde im Diagramm gekennzeichnet (*). Durch die Komplementation der *rtel1-1* Linie mit *RTEL1* konnte in den Komplementationslinien (JR448, JR449, JR450) die HR-Rate wieder auf das Wildtypniveau reduziert werden. Für die *srs2-2* Mutante konnte keine Funktion in der HR nachgewiesen werden. Da die Doppelmutante *rtel1-1 srs2-2* keine signifikant erhöhte HR-Rate im Vergleich zu *rtel1-1* aufwies (ns), konnte eine redundante Funktion der beiden Helikasen ausgeschlossen werden. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Rekombinationsrate von *fancm-1* konnte in dieser Arbeit zwar nicht signifikant bestätigt werden, dennoch war eine leicht erhöhte HR-Rate erkennbar. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* eine höhere HR-Rate aufwies als die beiden Einzelmutanten und der Wildtyp. Zur Bestimmung der Signifikanz wurden die Linien paarweise mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz verglichen und der p-Wert berechnet. Für das Paar WT/*fancm-1* konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der HR-Rate festgestellt werden. Das Paar *rtel1-1/rtel1-1 fancm-1* besaß einen p-Wert <0,01. Für die anderen Paare wurde jeweils ein p-Wert <0,001 berechnet (Abbildung 3.6).

Weiterhin sollte in denselben Linien die HR-Rate nach Zugabe von Genotoxinen getestet werden. Durch Bleomycin (5 µg/ml) wurden DSBs induziert. Ein möglicher Mechanismus zur Reparatur dieser Schäden ist die HR, welche den Anstieg der Rekombinationsrate vom Wildtyp im Vergleich zum Grundzustand erklärt. Für die Linie *fancm-1* wurde eine reduzierte HR-Rate im Vergleich zum Wildtyp bereits beschrieben (Knoll *et al.*, 2012). Dieser Phänotyp konnte in dieser Arbeit mit einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ bestätigt werden. Im Vergleich zum Wildtyp wies die Linie *rtel1-1* nach Bleomycinbehandlung ebenfalls eine erniedrigte Rekombinationsrate auf ($p < 0,05$). Die durchschnittliche Anzahl blauer Sektoren in *rtel1-1* war vergleichbar mit *fancm-1*.

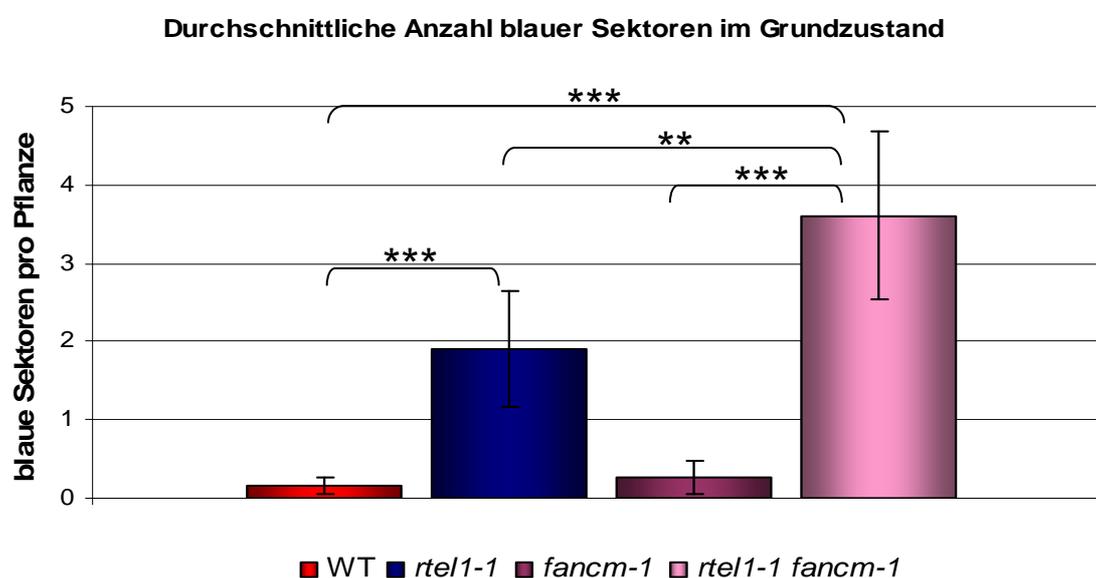


Abbildung 3.6: Rekombinationsrate von *rtel1-1* und *fancm-1*. Die Rekombinationsrate wurde mit Hilfe des Reporterkonstrukts IC9 bestimmt. Im Gegensatz zur erhöhten HR-Rate von *rtel1-1* war die HR-Rate von *fancm-1* im Vergleich zum Wildtyp (WT) nur leicht erhöht. Für die Doppelmutante konnte eine höhere HR-Rate als für beide Einzelmutanten festgestellt werden. Die Mittelwerte von acht unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert < 0,01 (**); p-Wert < 0,001 (***)).

Bei der Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (Abbildung 3.7 A).

Durch das CL-verursachende *cis*-Platin kann es zur Blockade an Replikationsgabeln kommen. Diese Schäden können während der Replikation unter anderem durch HR repariert werden. Nach *cis*-Platin-Induktion (3 μ M) verhielten sich die Mutantenlinien im Bezug auf den Wildtyp ähnlich wie im Grundzustand.

Die HR-Rate in *rtel1-1* war im Vergleich zum Wildtyp mit einem Signifikanzniveau $p < 0,001$ erhöht. Die bereits bekannte, vergleichbare Rekombinationsrate zwischen Wildtyp und *fancm-1* nach *cis*-Platin konnte reproduziert werden. Die HR-Rate der Doppelmutante war im Vergleich zu beiden Einzelmutanten und zum Wildtyp erhöht ($p < 0,001$; Abbildung 3.7 B).

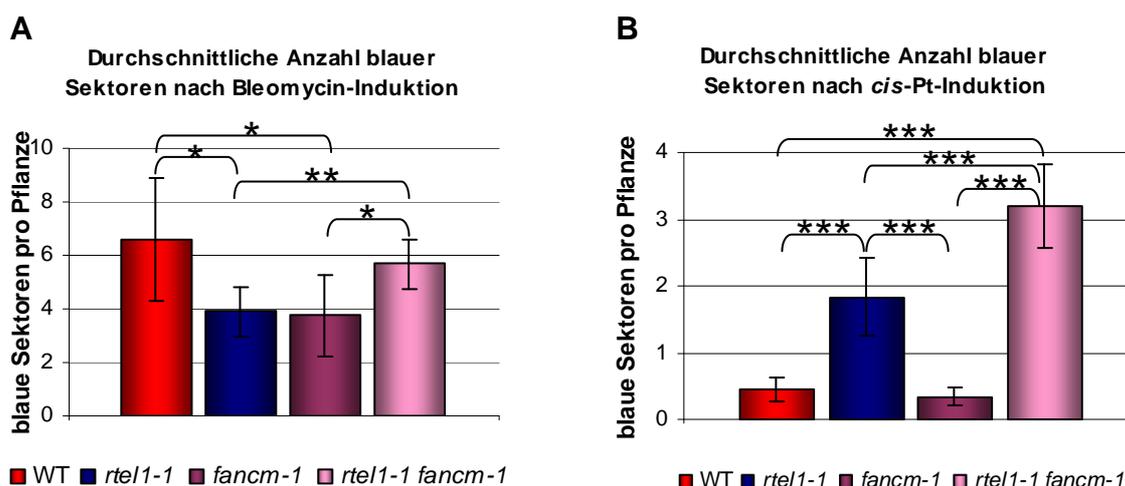


Abbildung 3.7: Rekombinationsrate von *rtel1-1* und *fancm-1* nach Genotoxin-Behandlung. Die Rekombinationsrate wurde mit Hilfe des Reporterkonstrukts IC9 bestimmt. **A)** Nach DSB-Induktion durch Bleomycin (5 μ g/ml) war die HR-Rate sowohl von *rtel1-1* als auch *fancm-1* niedriger als im Wildtyp (WT). Untereinander war die HR-Rate beider Einzelmutanten vergleichbar. Die Doppelmutante hatte eine vergleichbare HR-Rate mit dem Wildtyp (WT). **B)** Nach Induktion mit dem CL-verursachenden *cis*-Platin (3 μ M) war die HR-Rate von *fancm-1* vergleichbar mit der vom Wildtyp (WT) und die von *rtel1-1* erhöht. Für die Doppelmutante konnte eine höhere HR-Rate als für beide Einzelmutanten festgestellt werden. Die Mittelwerte von sechs unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $< 0,05$ (*); p-Wert $< 0,01$ (**); p-Wert $< 0,001$ (***)

3.1.6 Rolle von *AtRTEL1* in der Reparatur von DNA-Schäden

Sowohl für *CeRTEL1* als auch für das Analogon *ScSRS2* wurde eine Rolle in der Reparatur von ICLs nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob *AtRTEL1* ebenfalls eine Funktion bei der Reparatur von CLs hat. Dafür wurden eine Woche alte Keimlinge mit unterschiedlichen Konzentrationen der Genotoxine *cis*-Platin und Mitomycin C (MMC) behandelt. Mit steigenden Konzentrationen der Genotoxine nahmen die DNA-Schäden in allen Linien zu. Die Folge war ein beschränktes Pflanzenwachstum, welches mit dem Frischgewicht korrelierte. Nach weiteren zwei Wochen wurde für jede Genotoxinkonzentration das relative Frischgewicht bezogen auf die unbehandelte Kontrolle bestimmt. Durch den Vergleich mit dem Wildtyp konnte festgestellt werden, ob die Mutante sensitiver auf das Genotoxin reagierte. So konnten Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle von *RTEL1* in der Reparatur dieser Schäden gezogen werden.

MMC verursacht hauptsächlich DNA-*interstrand-crosslinks*. Im Vergleich zum Wildtyp konnte in *rtel1-1* kein vermindertes Wachstum nach Zugabe vier unterschiedlicher Konzentrationen festgestellt werden (Abbildung 3.8).

Anders als im Menschen konnte bei einem Defekt von *FANCM* in *A. thaliana* keine Sensitivität gegenüber ICL-verursachenden Genotoxinen nachgewiesen werden (Knoll *et al.*, 2012). Dennoch konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass der gleichzeitige Verlust von *AtFANCM* und *AtRECQ4A* in einer Hypersensitivität gegenüber ICLs resultiert. Demnach agieren *AtFANCM* und *AtRECQ4A* in parallelen Reparaturwegen (Dangel *et al.*, 2014). Der Anstieg der HR-Rate

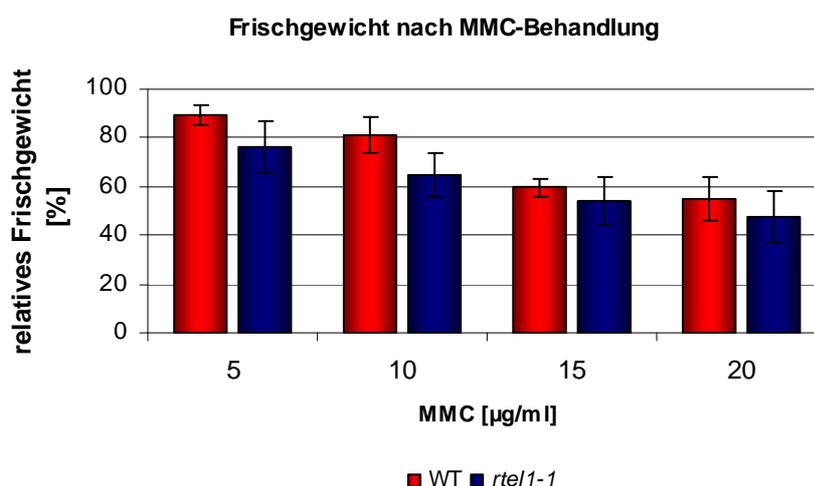


Abbildung 3.8: Sensitivität von *rtel1-1* gegenüber MMC. Die Mutantenlinie *rtel1-1* und der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt. Das gemessene Frischgewicht der behandelten Pflanzen wurde in Relation zu den entsprechenden unbehandelten Pflanzen gesetzt. Im Vergleich zum Wildtyp reagierte *rtel1-1* nach MMC-Behandlung nicht sensitiver. Die Mittelwerte von mindestens vier unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung.

nach Induktion mit *cis*-Platin deutet ebenfalls auf eine Funktion von *A*FANCM an den Replikationsgabeln hin (Knoll *et al.*, 2012; Abbildung 3.7). Weiterhin konnte bei der Untersuchung der somatischen HR in dieser Arbeit bei der Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* eine höhere HR-Rate als bei beiden Einzelmutanten nachgewiesen werden. Aus diesen Gründen wurde die Doppelmutante ebenfalls mit MMC behandelt und ihre Sensitivität mit denen der Einzelmutanten und des Wildtyps verglichen.

Wie zuvor erwähnt, konnte weder für *rtel1-1* noch für *fancm-1* eine erhöhte Sensitivität nach MMC-Behandlung gegenüber dem Wildtyp ermittelt werden. Im Gegensatz dazu reagierte die Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* hypersensitiv auf MMC-Behandlung. Die Signifikanz wurde paarweise berechnet. Das Frischgewicht der Doppelmutante war bei allen getesteten MMC-Konzentrationen signifikant niedriger als das des Wildtyps (Abbildung 3.9).

Während durch eine MMC-Behandlung vermehrt DNA-*interstrand-crosslinks* auftreten, verursacht *cis*-Platin vermehrt *intrastrand-crosslinks* in der DNA. Die Auswirkung dieses Genotoxins auf *rtel1-1* wurde ebenfalls untersucht und mit *fancm-1*, der entsprechenden Doppelmutante und dem

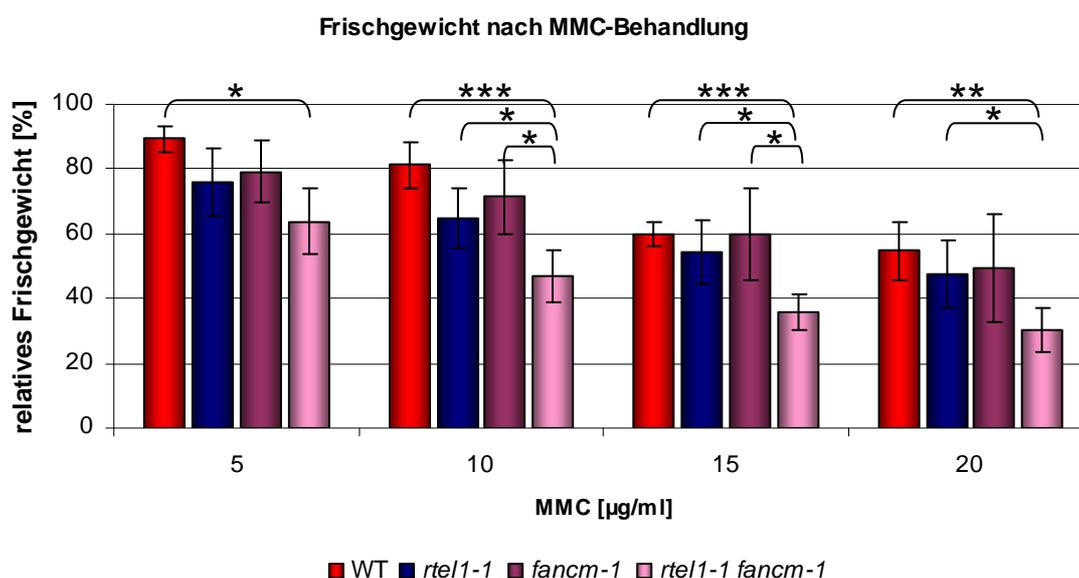


Abbildung 3.9: Sensitivität der Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* gegenüber MMC. Die Mutantenlinien *rtel1-1*, *fancm-1*, *rtel1-1 fancm-1* und der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt. Das gemessene Frischgewicht der behandelten Pflanzen wurde in Relation zu den entsprechenden unbehandelten Pflanzen gesetzt. Weder *rtel1-1* noch *fancm-1* reagierten auf eine MMC-Behandlung sensitiver als der Wildtyp. Im Gegensatz dazu reagierte die Doppelmutante sensitiver als der Wildtyp beziehungsweise als beide Einzelmutanten. Die Mittelwerte von mindestens vier unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert < 0,05 (*); p-Wert < 0,01 (**); p-Wert < 0,001 (***)

Wildtyp verglichen. Anders als nach MMC-Behandlung reagiert *rtel1-1* nach *cis*-Platin-Behandlung hypersensitiv. Durch die erfolgreiche Komplementation dieses Phänotyps in den drei Komplementationslinien (JR448, JR449, JR450) konnte bewiesen werden, dass die erhöhte Sensitivität tatsächlich durch einen Defekt in RTEL1 ausgelöst wurde. Im Gegensatz zur Mutantenlinie *rtel1-1* zeigten die Komplementationslinien keine Hypersensitivität gegenüber *cis*-Platin und hatten ein mit dem Wildtyp vergleichbares Frischgewicht (Abbildung 3.10). Wie erwartet, wies *fancm-1* keine erhöhte Sensitivität gegenüber *cis*-Platin auf. Die Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* reagierte signifikant sensitiver als die *rtel1-1* Einzelmutante und der Wildtyp. Das relative Frischgewicht von *rtel1-1* lag nach Behandlung mit den verschiedenen *cis*-Platin-Konzentrationen zwischen 81 % und 60 % und das von der Doppelmutante reduzierte sich noch weiter auf ein relatives Frischgewicht zwischen 64 % und 35 % (Abbildung 3.11).

Mit MUS81 ist ein weiteres Protein bekannt, welches eine wichtige Rolle in der Reparatur von blockierten und kollabierten Replikationsgabeln spielt. Die Endonuklease bildet zusammen mit EME1 einen Nukleasekomplex, der in der Lage ist Rekombinationsintermediate wie beispielsweise D-Loops und HJs mit Einzelstrangbrüchen aufzulösen (Haber und Heyer, 2001). In *A. thaliana* konnten drei unabhängige Wege zur Reparatur von CLs nachgewiesen werden. Neben dem RECQ4A-abhängigen und dem RAD5A-abhängigen Reparaturweg konnte im dritten Weg MUS81 als Hauptfaktor identifiziert werden (Mannuss *et al.*, 2010). In *C. elegans* resultiert eine gleichzeitige Mutation von RTEL1 und dem MUS81-Homolg in embryonaler

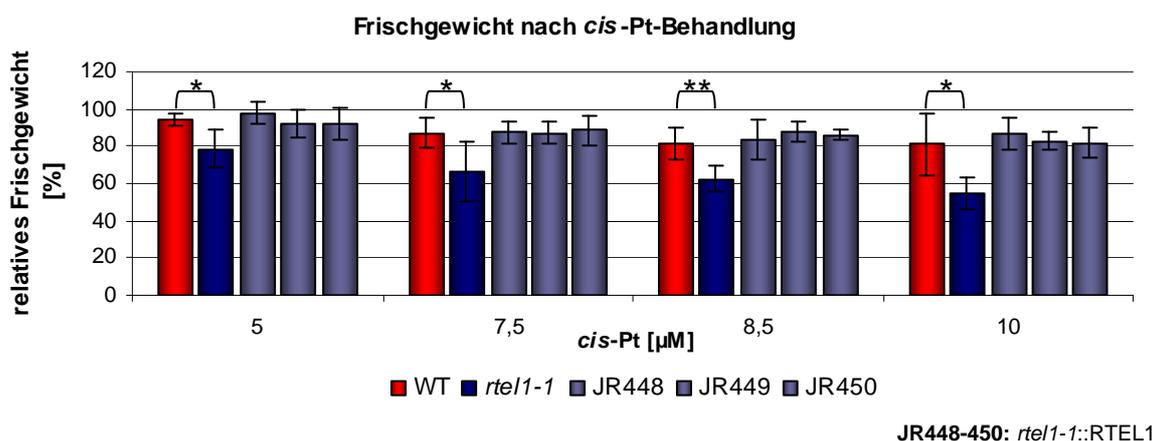


Abbildung 3.10: Sensitivität von *rtel1-1* gegenüber *cis*-Platin. Die Mutantenlinie *rtel1-1*, der Wildtyp (WT) und die Komplementationslinien (JR448, JR449, JR450) wurden mit 5, 7,5, 8,5 und 10 μ M *cis*-Platin (*cis*-Pt) behandelt. Das gemessene Frischgewicht der behandelten Pflanzen wurde in Relation zu den entsprechenden unbehandelten Pflanzen gesetzt. Die erhöhte Sensitivität von *rtel1-1* konnte in den Komplementationslinien wieder auf Wildtypniveau reduziert werden. Die Mittelwerte von fünf unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Der signifikante Unterschied zwischen dem Frischgewicht vom Wildtyp und *rtel1-1* wurde im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert < 0,05 (*); p-Wert < 0,01 (**).

Letalität (Barber *et al.*, 2008). Um festzustellen, ob RTEL1 und MUS81 in einem gemeinsamen Weg oder in unabhängigen Wegen eine Rolle in der Reparatur von CLs spielen, wurde die Doppelmutante *rtel1-1 mus81* gekreuzt und das Frischgewicht nach MMC- beziehungsweise *cis*-Platin-Behandlung bestimmt.

Für *mus81-1* konnte die bereits bekannte Hypersensitivität gegenüber MMC und *cis*-Platin in dieser Arbeit reproduziert werden (Hartung *et al.*, 2006; Berchowitz *et al.*, 2007). Während die Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* auf MMC ähnlich sensitiv wie die *mus81-1* Einzelmutante reagierte, konnte nach *cis*-Platin-Behandlung eine höhere Sensitivität als in beiden Einzelmutanten festgestellt werden. Das relative Frischgewicht von *rtel1-1* befand sich nach Behandlung mit den verschiedenen *cis*-Platin-Konzentrationen zwischen 81 % und 60 %, das von *mus81-1* zwischen 64 % und 41 % und das relative Frischgewicht von *rtel1-1 mus81-1* reduzierte sich noch weiter auf Werte zwischen 55 % und 33 %. Zur Bestimmung der Signifikanz wurden die Linien paarweise mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz verglichen und der p-Wert berechnet. Nach Behandlung mit 5 μM beziehungsweise 8,5 μM *cis*-Platin besaß das Paar *mus81-1/rtel1-1 mus81-1* einen p-Wert $< 0,01$ und nach Behandlung mit 10 μM *cis*-Platin einen p-Wert $< 0,05$. Die Ausnahme bildete das Paar nach Behandlung mit 7,5 μM *cis*-Platin. Hier konnte kein signifikanter Unterschied berechnet werden (Abbildung 3.12).

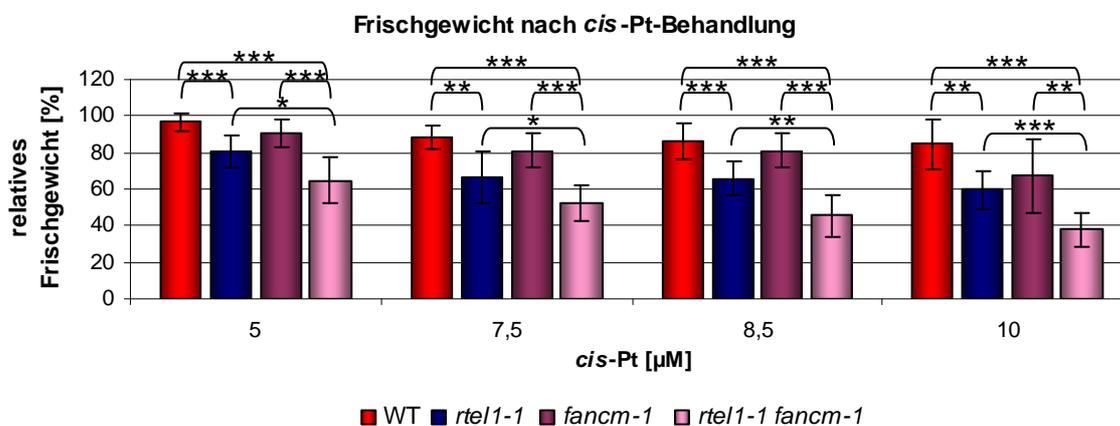


Abbildung 3.11: Sensitivität von *rtel1-1 fancm-1* gegenüber *cis*-Platin. Die Mutantenlinien *rtel1-1*, *fancm-1*, *rtel1-1 fancm-1* und der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 7,5, 8,5 und 10 μM *cis*-Platin (*cis*-Pt) behandelt. Das gemessene Frischgewicht der behandelten Pflanzen wurde in Relation zu den entsprechenden unbehandelten Pflanzen gesetzt. Das Frischgewicht von *fancm-1* war vergleichbar mit dem vom Wildtyp. Die Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* reagierte noch sensitiver als die *rtel1-1* Einzelmutante. Die Mittelwerte von acht unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $< 0,05$ (*); p-Wert $< 0,01$ (**); p-Wert $< 0,001$ (***)).

3.1.7 Einfluss von *ARTEL1* und *AMUS81* auf die Fertilität

In *A. thaliana* konnte bereits gezeigt werden, dass ein Defekt von *MUS81* zu einer geringeren Fertilität in der Mutante führt (Berchowitz *et al.*, 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es durch den Verlust von *RTEL1* zu einer verminderten Anzahl an Samen pro Schote kommt (Knoll, 2011). Während der Anzucht der Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* erschien die Samenanzahl pro Schote noch geringer als bei beiden Einzelmutanten. Um dies zu überprüfen, wurden von fünf Pflanzen der jeweiligen Mutantenlinie und des Wildtyps stichprobenartig jeweils fünf reife Schoten geerntet und für diese Pflanzen die durchschnittliche Samenanzahl pro Schote bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Samen pro Schote und damit die Fertilität der Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp und zu beiden Einzelmutanten stark reduziert war. Während die durchschnittliche Samenanzahl pro Schote vom Wildtyp circa 45 betrug und die der beiden Einzelmutanten circa 30, war die Anzahl in *rtel1-1 mus81-1* mit einer durchschnittlichen Anzahl von circa 5 Samen pro Schote deutlich geringer. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Fertilität der *rtel1-1* Einzelmutante durch die Komplementation mit dem *RTEL1*-

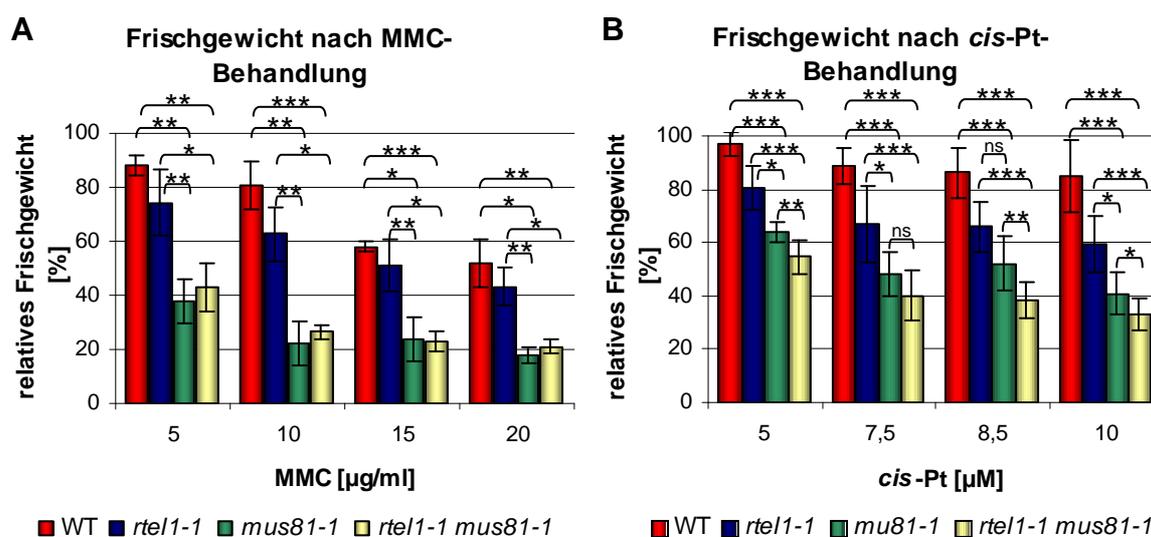
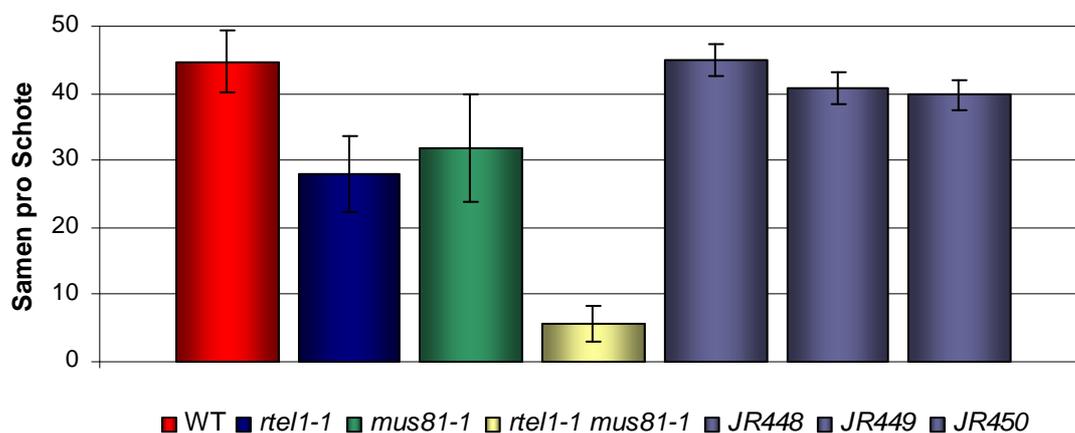


Abbildung 3.12: Sensitivität von *rtel1-1 mus81-1* gegenüber MMC und *cis*-Platin. Die Mutantenlinien *rtel1-1*, *mus81-1*, *rtel1-1 mus81-1* und der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC beziehungsweise mit 5, 7,5, 8,5 und 10 µM *cis*-Platin (*cis*-Pt) behandelt. Das gemessene Frischgewicht der behandelten Pflanzen wurde in Relation zu den entsprechenden unbehandelten Pflanzen gesetzt. **A)** Nach MMC-Behandlung war die Sensitivität der Doppelmutante vergleichbar mit der bereits bekannten Hypersensitivität der *mus81-1* Einzelmutante. **B)** Nach *cis*-Platin-Behandlung reagierte die Doppelmutante noch sensitiver als beide Einzelmutanten. Die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert < 0,05 (*); p-Wert < 0,01 (**); p-Wert < 0,001 (***). Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde der zuvor beschriebene signifikante Unterschied zwischen Wildtyp und *rtel1-1* nach *cis*-Platin-Behandlung in diesem Diagramm nicht gekennzeichnet.

Wildtypkonstrukt wieder aufgehoben werden konnte. In den Komplementationslinien (JR448, JR449, JR450) stieg die Anzahl der Samen pro Schote wieder auf Wildtyp-Niveau (Abbildung 3.13).

Eine geringere Fertilität kann mehrere Gründe haben. Zum einen könnte sie auf eine fehlerhafte Meiose zurückzuführen sein, zum anderen könnte sie auf eine anschließende fehlerhafte Gametophytenentwicklung hindeuten. Ein Defekt von *MUS81* resultiert in *A. thaliana* in einer verringerten Anzahl an COs während der Meiose und einer eingeschränkten Pollenvitalität (Berchowitz *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die eingeschränkte Fertilität in *rtel1-1* ebenfalls auf Defekte in der Meiose beziehungsweise auf eine reduzierte Pollenvitalität zurückzuführen war.

Zur Untersuchung der Meiose wurden DAPI-gefärbte Meiosepräparate von Pollenmutterzellen der Mutantenlinie *rtel1-1* angefertigt. Um mögliche Defekte während der Meiose zu identifizieren und die Funktion von RTEL1 in die Meiose einzuordnen, wurden neben der Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* außerdem weitere Doppelmutanten mit Defekten in bekannten Meiose-relevanten Genen (unter anderem SPO11, MSH4/5 und RMI1) untersucht. Allerdings konnte in *rtel1-1* während der Meiose weder ein abweichender Phänotyp noch ein Abbruch der Meiose festgestellt werden (nicht gezeigt).



JR448-450: *rtel1-1::RTEL1*

Abbildung 3.13: Anzahl der Samen pro Schote. Für die Linien *rtel1-1*, *mus81-1*, *rtel1-1 mus81-1*, den Wildtyp und die Komplementationslinien (JR448, JR449, JR450) wurden jeweils bei fünf Pflanzen von fünf Schoten die Samenanzahl pro Schote bestimmt, die durchschnittliche Anzahl pro Schote berechnet und als Säulen dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Für die Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* wurde eine noch geringere Samenanzahl pro Schote festgestellt als für beide Einzelmutanten. In den Komplementationslinien konnte wieder das Wildtyp-Niveau erreicht werden.

Mit Hilfe der Alexanderfärbung (Alexander, 1969) wurden komplette Antheren gefärbt. Durch diese Färbung konnte zwischen lebensfähigen (pink bis lila) und toten Pollen (grün bis blau) unterschieden werden. Bei einer fehlerhaften Pollenentwicklung sollte es demnach zur vermehrten Bildung nicht lebensfähiger Pollen kommen. Zudem sollte mit dieser Methode überprüft werden, ob in *rtel1-1* während der Meiose möglicherweise weniger Mikrosporencellen gebildet werden. Wäre dies der Fall, könnten sich in der anschließenden Pollenentwicklung auch nur weniger Pollen bilden.

Im Vergleich zum Wildtyp konnten bei *rtel1-1* sowie bei *mus81-1* mehr tote Pollen beobachtet werden. Allerdings wurden auch viele Antheren beobachtet, in denen das Verhältnis zwischen toten und lebensfähigen Pollen ähnlich wie beim Wildtyp war. Insgesamt erschienen die Antheren der Mutantenlinie jedoch kleiner und leerer. Um dieses Erscheinungsbild zu überprüfen und statistisch auszuwerten, wurde mit Hilfe des Programms ImageJ der Flächeninhalt der Antheren gemessen und mit dem des Wildtyps verglichen. Für die Präparation der Antheren wurden Blüten des Stadiums 12 bis 13 verwendet (Smyth *et al.*, 1990). Es wurde darauf geachtet, dass alle gemessenen Antheren in der gleichen Ausrichtung lagen und das Konnektiv immer mittig zwischen den Theken lag. Der Flächeninhalt der Antheren war in den Mutantenlinien kleiner als der von den Wildtyp-Antheren. Ein additiver Effekt in der Doppelmutante konnte nicht festgestellt werden. (Abbildung 3.14).

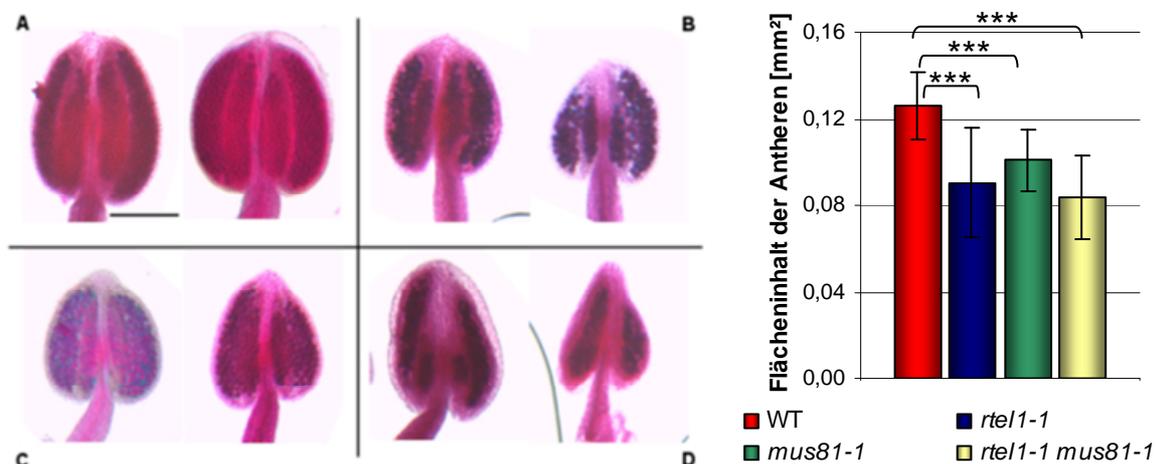


Abbildung 3.14: Pollenvitalität in *rtel1-1 mus81-1*. Die Antheren vom Wildtyp (WT; A), *mus81-1* (B), *rtel1-1* (C) und der Doppelmutanten *rtel1-1 mus81-1* (D) wurden mit Hilfe von Alexanderfärbung gefärbt. So konnte zwischen lebensfähigen (pink bis lila) und toten Pollen (grün bis blau) unterschieden werden. Da die Antheren beider Einzelmutanten sowie der Doppelmutante leerer und kleiner erschienen, wurde der Flächeninhalt gemessen und graphisch dargestellt. Pro Linie wurde der durchschnittliche Flächeninhalt aus 30 Antheren bestimmt und als Säulen dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Der durchschnittliche Flächeninhalt der Mutantenlinien war kleiner als beim Wildtyp. Ein additiver Effekt in der Doppelmutante konnte nicht festgestellt werden. Maßstabsbalken: 200 μ m.

Des Weiteren wurde überprüft, ob die eingeschränkte Fertilität von *rtell-1 mus81-1* nur auf die männliche Gametogenese zurückzuführen war oder ob die Mutante sowohl in der weiblichen als auch männlichen Gametogenese eingeschränkt war. Hierfür wurde die Doppelmutante mit dem Wildtyp gekreuzt. Bei diesem Rückkreuzungsversuch wurde einmal der Wildtyp-Pollen auf den Fruchtknoten der Mutante überführt und das andere Mal der Pollen der Mutante auf den Wildtyp-Fruchtknoten überführt. Wäre nur die männliche Gametogenese betroffen, würde im Fall mit den Wildtyp-Pollen die Befruchtung fehlerfrei verlaufen und es würden sich normal große Schoten bilden. Um die Effizienz der Kreuzung zu überprüfen, wurden parallel Wildtyp-Pflanzen miteinander gekreuzt. Nach Samenreife wurde die durchschnittliche Samenzahl pro Schoten berechnet. Sowohl nach Verwendung der Mutanten-Pollen als auch der Wildtyp-Pollen bildete sich nach Rückkreuzung der Doppelmutante *rtell-1 mus81-1* mit dem Wildtyp eine reduzierte Samenzahl pro Schote (Abbildung 3.15)

3.1.8 Die Doppelmutante *rtell-1 recq4A-4*

Einer der Gründe warum RTEL1 als funktionelles Analogon von SRS2 identifiziert wurde, war der charakteristische Phänotyp bei der gleichzeitigen Mutation von *SRS2* und der RecQ-Helikase *SGS1* in Hefe beziehungsweise *RTEL1* und dem *SGS1*-Homolog *HIM6* in *C. elegans*. Beide Doppelmutanten sind aufgrund der Ansammlung toxischer Rekombinationsintermediate letal (Barber *et al.*, 2008). Weiterhin konnte in Mäusen gezeigt werden, dass sowohl RTEL1 als auch die RecQ-Helikase BLM eine wichtige Rolle bei der Auflösung von T-Loops an den Telomeren spielen und der Verlust von RTEL1 zu einem rapiden Telomerverlust führt (Sfeir *et al.*, 2009; Vannier *et al.*, 2012). Hier sollte untersucht werden, ob eine Mutation der Homologe *ARTEL1* und *AtRECQ4A* in *A. thaliana* ähnlich schwere Folgen hat. Hierzu wurde die Doppelmutante

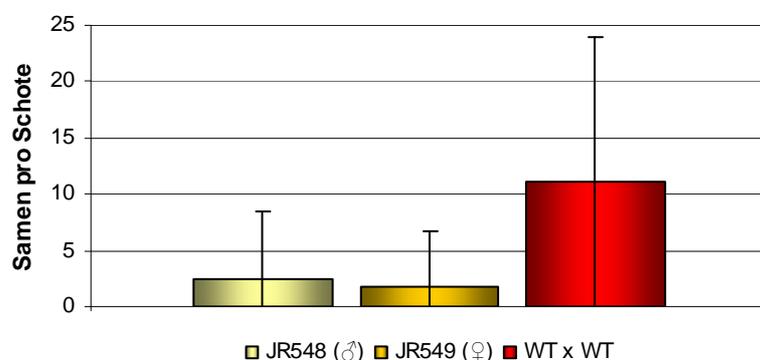


Abbildung 3.15: Rückkreuzung von *rtell-1 mus81-1* mit dem Wildtyp. Um zu untersuchen, ob die eingeschränkte Fertilität von *rtell-1 mus81-1* auf die männliche und weibliche Gametogenese zurückzuführen war, wurde die Doppelmutante mit dem Wildtyp gekreuzt. **JR548 (♂):** *rtell-1 mus81-1* (♂) x WT (♀); **JR549 (♀):** *rtell-1 mus81-1* (♀) x WT (♂); **WT x WT:** Kreuzung von Wildtyp-Pflanzen zur Kontrolle.

rtel1-1 recq4A-4 untersucht. Schon bei der Etablierung der Doppelmutante wurden in der homozygoten Linie enorme Wuchsdefekte beobachtet. Die homozygoten Pflanzen wiesen eine vom Wildtyp abweichende Blattmorphologie auf. Zudem wurden Verwachsungen der Triebe beobachtet und die Pflanzen waren steril (Abbildung 3.16). Aufgrund dieser schweren Wuchsdefekte in der Doppelmutante war eine Charakterisierung mit Hilfe von Rekombinations- und Sensitivitätstest nur erschwert möglich. Da die Linie steril war, musste sie heterozygot etabliert werden und für alle weiteren Untersuchungen zur Bestimmung der homozygoten Pflanzen genotypisiert werden. Da sowohl für die Bestimmung der Sensitivität als auch für die Bestimmung der HR-Rate die kompletten Keimlinge benötigt werden, wird bei heterozygoten Pflanzen üblicherweise die DNA aus den Wurzeln extrahiert und zur anschließenden Genotypisierung der Pflanzen verwendet. Im Fall der Mutantenlinie *rtel1-1 recq4A-4* waren die Wurzeln enorm verkürzt, sodass eine zu geringe Menge DNA extrahiert werden konnte. Zudem waren die Pflanzen deutlich kleiner als der Wildtyp, was einen Vergleich mit dem Wildtyp und den Einzelmutanten nicht möglich machte. Da die gleichzeitige Mutation der beiden Helikasen jedoch offensichtlich schwere Folgen auf *A. thaliana* hatte, war die Untersuchung dieser Linie von besonderer Wichtigkeit. Eine Möglichkeit bestand in der Untersuchung der Wurzeln.

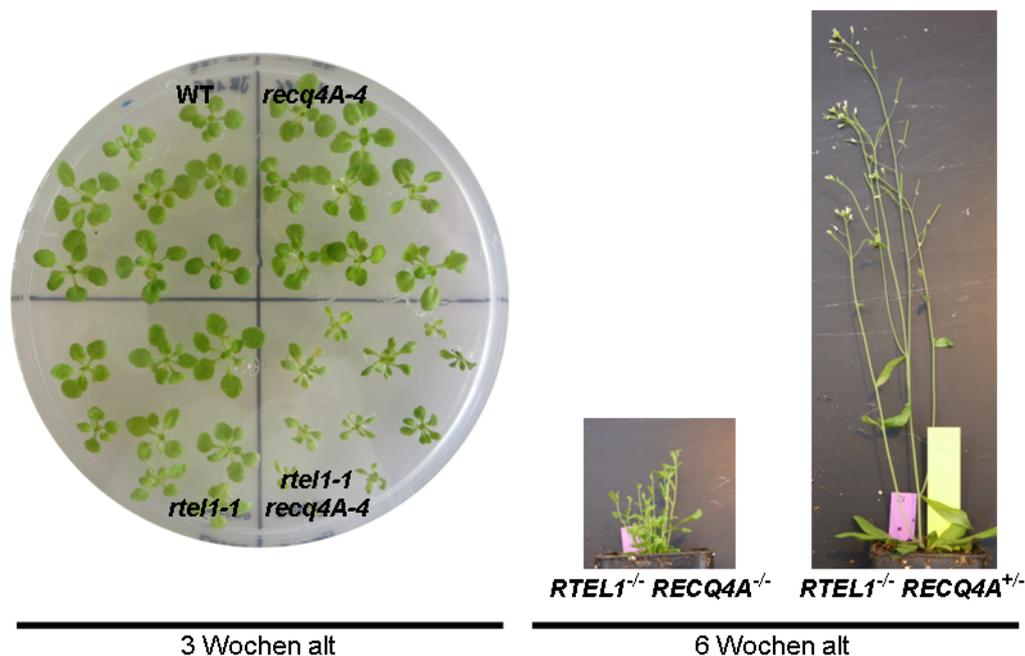


Abbildung 3.16: Wuchsdefekte von *rtel1-1 recq4A-4*. Nach zwei Wochen Anzucht im Inkubationsschrank zeigten sich in der Doppelmutante *rtel1-1 recq4A-4* deutliche Wuchsdefekte und die Blattmorphologie war verändert. Die Wuchsdefekte konnten während der anschließenden Anzucht in Erde nicht mehr ausgeglichen werden. Die Pflanzen blieben kleiner als der Wildtyp (WT) und die Einzelmutanten und bildeten keine Schoten.

3.1.9 Die Rolle von *ARTEL1* im Wurzelmeristem

Wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben, waren stark verkürzte Wurzeln ein Merkmal der *rtel1-1 recq4A4* Doppelmutante. Verkürzte Wurzeln lassen sich auf Defekte in der Wurzelentwicklung und auf eine fehlerhafte Zellteilung zurückführen. Zunächst wurde die Wurzellänge der Doppelmutante gemessen und mit der des Wildtyps und der Einzelmutanten verglichen. In den Linien *rtel1-1 fancm-1* beziehungsweise *rtel1-1 mus81-1* konnte zuvor gezeigt werden, dass auch diese Proteine eine Rolle in der Reparatur von DNA-Schäden an Replikationsgabeln spielen (Abschnitt 3.1.6). Durch die Untersuchung der Wurzeln sollte analysiert werden, welche Auswirkung der Verlust dieser Proteine auf die Zellteilung und die Entwicklung im Wurzelmeristem hat. Daher wurde auch bei diesen Mutantenlinien die Wurzellänge bestimmt.

Hierzu wurden die Wurzeln von sieben Tage alten Pflanzen mit Hilfe des Programms SmartRoot (Lobet *et al.*, 2011) gemessen. Die Wurzellänge von mindestens 30 Wurzeln aus mehreren unabhängigen Durchgängen wurde bestimmt und die durchschnittliche Länge pro Linie berechnet. Die Wurzellänge der Mutantenlinien *recq4A4* und *fancm-1* war vergleichbar mit der Länge des Wildtyps. Die Wurzeln von *rtel1-1* und *mus81-1* waren nach sieben Tagen Anzucht kürzer als die des Wildtyps. Die Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* wies noch kürzere Wurzeln als beide Einzelmutanten auf. Die Wurzellänge von *rtel1-1 fancm-1* entsprach der von *rtel1-1*. Besonders auffallend waren die kurzen Wurzeln von *rtel1-1 recq4A4*. Bei dieser Linie entwickelten sich die Wurzeln im Vergleich zu den Wildtyp-Wurzeln und denen der beiden Einzelmutanten deutlich langsamer und waren nach sieben Tagen extrem kurz. Nach Komplementation der Mutantenlinie *rtel1-1* mit dem *RTEL1*-Wildtypkonstrukt erreichten die Komplementationslinien (JR448, JR449, JR450) wieder eine vergleichbare Wurzellänge mit dem Wildtyp (Abbildung 3.17).

Durch die Untersuchung des Wurzelmeristems nach Propidiumiodid-Färbung konnte die Wurzelentwicklung noch detaillierter untersucht werden. Das Wurzelmeristem besteht aus undifferenzierten, sich teilenden Zellen. Der Effekt von DNA-Schäden auf die Zellteilung kann in diesem Gewebe besonders gut überprüft werden. Die Zellteilung ist in der Wurzel auf das Meristem, bestehend aus der Stammzellnische (SZN) und den vorübergehend amplifizierenden Zellen (*transiently amplifying*, TA), beschränkt. Die verschiedenen Stammzellarten und die TA-Zellen können anhand der Lage relativ zum Ruhezentrum (*quiescent center*, QC) identifiziert werden. Ungefähr fünf bis sechs Zellreihen über der Wurzelspitze ist die Stammzellnische lokalisiert. Durch den Kontakt mit den Zellen des QCs bleiben die Stammzellen undifferenziert. Zellen des QCs teilen sich für gewöhnlich nicht. Aus vier verschiedenen Arten von Stammzellen entstehen durch Zellteilung die differenzierten Zellen der Wurzel: Aus einer Stammzellart differenzieren sich epidermale Zellen und die Zellen der lateralen Wurzelhaube. Eine weitere

Stamzellart differenziert sich zu Kortex- beziehungsweise Endodermiszellen. Aus den Columella-Stammzellen wird die zentrale Wurzelhaube gebildet, während die vaskulären Stammzellen das Leitgewebe bilden.

Zur Untersuchung, welche Auswirkungen die unterschiedlichen Mutationen auf die Replikation und Zellteilung hatten, wurden die Wurzeln nach fünf Tagen Anzucht mit Propidiumiodid gefärbt und mit einem Konfokalmikroskop ausgewertet. Da Propidiumiodid nicht in intakte Zellen eindringen kann, werden nur die toten Zellen gefärbt. Eine geringe Menge Propidiumiodid im Intrazellularraum bewirkt außerdem, dass die gesamte Wurzel schwach gefärbt ist. Die Färbung ermöglichte eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen. Mögliche Defekte während der Replikation und der daraus resultierende vermehrte Zelltod konnten auf diese Weise in den Mutanten und im Wildtyp identifiziert werden. Weiterhin wurde der Effekt von *cis*-Platin auf das sich teilende Wurzelmeristem untersucht. Durch die CL-verursachende Wirkung dieses Genotoxins konnten zusätzliche Schäden während der Replikation induziert werden. Würden die Proteine eine Rolle in der Reparatur dieser Schäden spielen, wäre ein

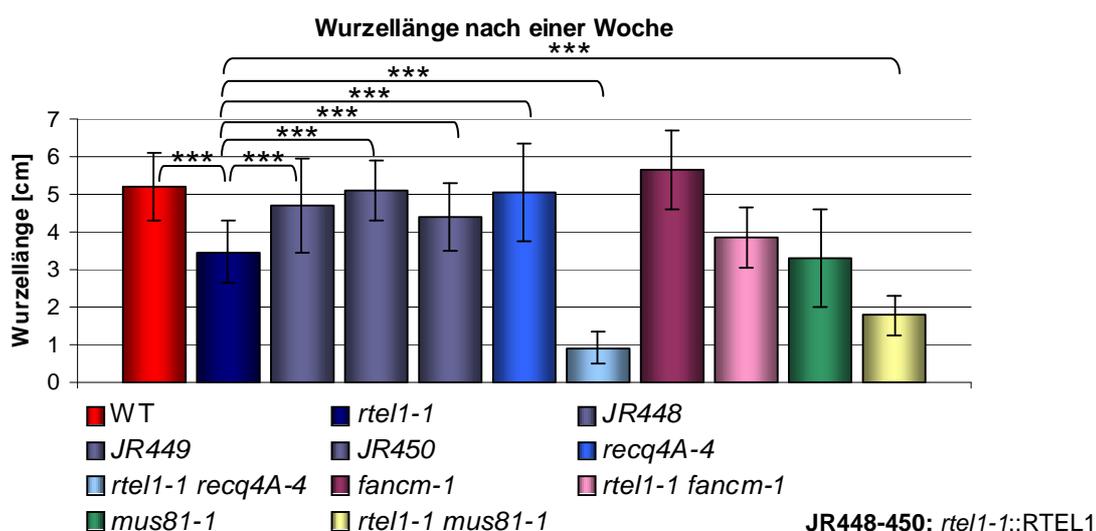


Abbildung 3.17: Wurzellänge nach einer Woche Anzucht. Nach einer Woche Anzucht wurde mit Hilfe von SmartRoot die Wurzellänge der Linien gemessen. Sowohl *rtel1-1* als auch *mus81-1* erreichten nach sieben Tagen eine kürzere Wurzellänge als der Wildtyp. Die Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* wies noch kürzere Wurzeln auf. Die Wurzellänge von *fancm-1* entsprach der vom Wildtyp (WT) und die der Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* entsprach der Wurzellänge von *rtel1-1*. Die Mutantenlinie *recq4A-4* erreichte eine Wurzellänge vergleichbar mit dem Wildtyp. Die Wurzeln von *rtel1-1 recq4A-4* waren extrem kurz. Nach Komplementation der Mutantenlinie *rtel1-1* mit dem *RTEL1*-Wildtypkonstrukt erreichten die Komplementationslinien (JR448, JR449, JR450) wieder eine vergleichbare Wurzellänge mit dem Wildtyp. Pro Linie wurde die durchschnittliche Wurzellänge aus mindestens 30 Wurzeln berechnet und als Säulen dargestellt. Die Balken entsprechen der Standardabweichung.

erhöhter Zelltod in den entsprechenden Mutantenlinien erkennbar. Auf diese Weise konnten die durch die Sensitivitätstests festgestellten Hypersensitivitäten von *rtel1-1* und den Doppelmutanten gegenüber *cis*-Platin überprüft werden.

rtel1-1

Im Grundzustand konnten in den Wurzeln vom Wildtyp nur selten tote Stammzellen beziehungsweise tote TA-Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wies *rtel1-1* eine vermehrte Menge an toten vaskulären Stammzellen und toten TA-Zellen auf (Abbildung 3.18). Dieser Effekt konnte durch die Behandlung mit *cis*-Platin verstärkt werden. Neben einer erhöhten Rate an toten TA-Zellen und toten vaskulären Stammzellen konnten außerdem tote Zellen in den anderen Stammzelltypen beobachtet werden. Zudem konnte in einigen Wurzeln eine veränderte Zellreihung in der SZN beobachtet werden (Abbildung 3.19). Um die Beobachtungen statistisch auszuwerten, wurde das Verhältnis von toten zu lebenden Zellen bestimmt. Die Häufigkeit von Wurzeln, in denen mindestens eine tote Zelle in der SZN gezählt wurde, wurde in Relation zu allen untersuchten Wurzeln einer Linie gesetzt. Dabei wurde zwischen toten vaskulären Stammzellen, toten TA-Zellen, anderen toten Stammzellen und einer veränderten SZN unterschieden. Hierbei wurden ebenfalls die RTEL1-Komplementationslinien (JR448, JR449, JR450) untersucht. Im Grundzustand wiesen beim Wildtyp nur wenige Wurzeln mindestens eine tote vaskuläre Stammzelle auf (~ 4 %). Ein Zelltod in anderen Zellarten konnte nicht beobachtet werden. In der Mutantenlinie *rtel1-1* war die Rate der Wurzeln mit mindestens einer toten vaskulären deutlich erhöht (~46 %). Zudem wurde eine erhöhte Rate an Wurzeln mit mindestens einer toten TA-Zelle festgestellt (~24 %). Die Rate der Wurzeln mit toten vaskulären Zellen konnte in den Komplementationslinien wieder auf Wildtyp-Niveau reduziert werden. Anders als im Wildtyp wurden in den Komplementationslinien Wurzeln mit toten TA-Zellen beobachtet. Die Rate war jedoch niedriger als im Wildtyp und schwankte in den drei Komplementationslinien zwischen 6 % und 16 %.

Wie erwartet, war die relative Anzahl der Wurzeln mit toten Zellen nach *cis*-Platin-Induktion erhöht. Neben Wurzeln mit toten vaskulären Stammzellen wurden im Wildtyp außerdem Wurzeln mit toten TA-Zellen beobachtet. In *rtel1-1* stieg die Rate an Wurzeln mit toten vaskulären Stammzellen und toten TA-Zellen auf ~ 90 %. Zudem wurde eine erhöhte Rate an Wurzeln mit anderen toten Stammzellen (~ 38 %) und eine erhöhte Rate an Wurzeln mit veränderter SZN beobachtet (~12 %). In den Komplementationslinien war die Rate an Wurzeln mit toten vaskulären Stammzellen sowie die Rate an Wurzeln mit toten TA-Zellen wieder auf das Wildtyp-Niveau reduziert. Die Rate an Wurzeln mit anderen toten Stammzellen war im Vergleich zu *rtel1-1* reduziert. Veränderte SZN wurden nicht beobachtet (Abbildung 3.20)

WT

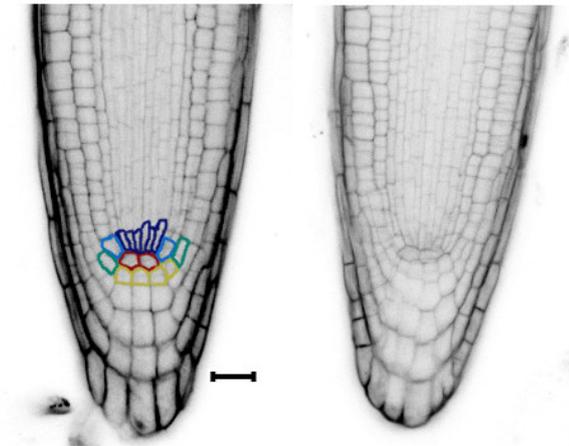
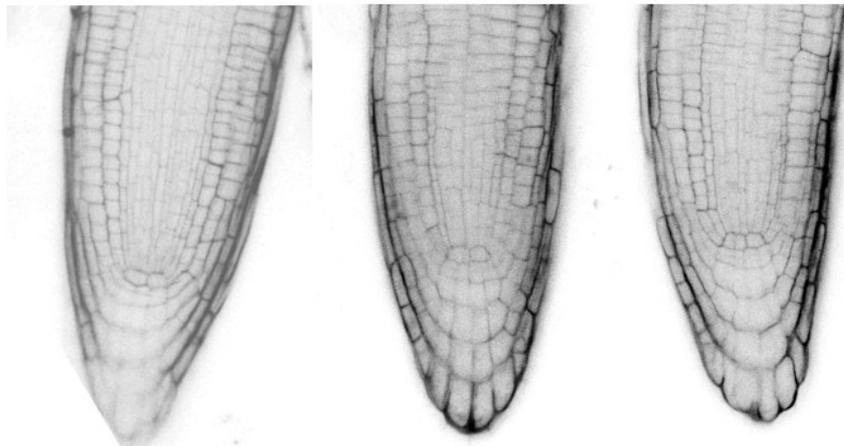
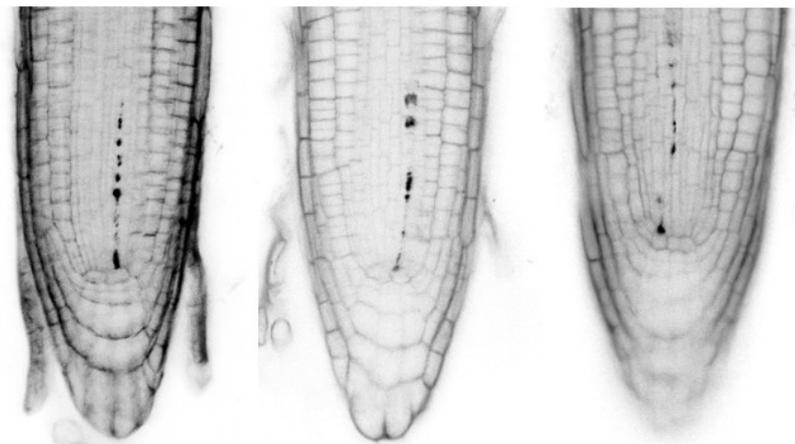
*recq4A-4**rtel1-1**rtel1-1 recq4A-4*

Abbildung 3.18: Zelltod im Wurzelmeristem von *rtel1-1 recq4A-4*. Legende auf nächster Seite.

Abbildung 3. 18: Zelltod im Wurzelmeristem von *rtell1-1 recq4A-4*. Abb. auf vorheriger Seite.

Die Wurzeln der Mutantenlinien und des Wildtyps (WT) wurden mit Propidiumiodid gefärbt und mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Das Wurzelmeristem des Wildtyps (WT) zeigte nur selten tote Zellen. Die SZN wurde farblich markiert. In *recq4A-4* wurden ebenfalls nur wenige tote Stammzellen beobachtet. Die Einzelmutante *rtell1-1* zeigte vermehrt tote TA-Zellen sowie tote vaskuläre Stammzellen. Andere tote Stammzellen wurden kaum beobachtet. Die Wurzeln der Doppelmutante *rtell1-1 recq4A-4* wiesen schwere Entwicklungsdefekte auf. Der Aufbau der SZN war stark verändert. Eine geordnete Zellreihung mit den verschiedenen Stammzellarten und dem Ruhezentrum konnte nicht mehr identifiziert werden. rot: Ruhezentrum (QC); dunkelblau: vaskuläre Stammzellen; hellblau: Kortex-/Endodermisstammzellen; grün: Stammzellen der Epidermis/lateralen Wurzelhaube; gelb: Collumella-Stammzellen.

rtell1-1 recq4A-4

Bei der Doppelmutante *rtell1-1 recq4A-4* wurden auffallend kurze Wurzeln beobachtet. Diese schweren Defekte während der Wurzelentwicklung sollten mittels Propidiumiodidfärbung näher untersucht werden. Anders als bei *rtell1-1* wurden bei der Einzelmutante *recq4A-4* im Grundzustand keine toten Zellen in der SZN beobachtet und es konnten keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Die bereits bekannte Hypersensitivität dieser Mutante gegenüber *cis*-Platin (Hartung *et al.*, 2007) zeigte sich auch in der Analyse des Wurzelmeristems. Nach *cis*-Platin-Behandlung traten vermehrt tote Zellen im Wurzelmeristem auf. Die Doppelmutante *rtell1-1 recq4A-4* wies schon im Grundzustand schwere Defekte auf. Die Wurzelmorphologie war stark verändert. Eine SNZ mit den üblichen Stammzellarten und der geordneten Zellreihung konnte nicht mehr identifiziert werden. Die Stammzellen starben in der Doppelmutante offenbar schon sehr früh, sodass kaum Zellen übrig blieben, die eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Stammzellen zuließen.

Aufgrund dieser schweren Auswirkungen auf die Wurzelentwicklung war die Quantifizierung der Wurzeln mit toten Zellen nicht möglich. Die Wurzeln der Doppelmutante waren schon im Grundzustand stark degeneriert, eine Steigerung dieses Phänotyps durch *cis*-Platin-Induktion wurde nicht beobachtet (Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19).

WT

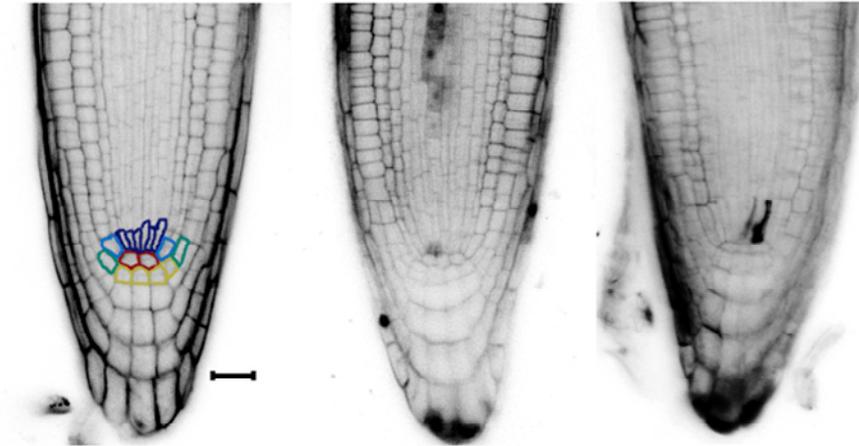
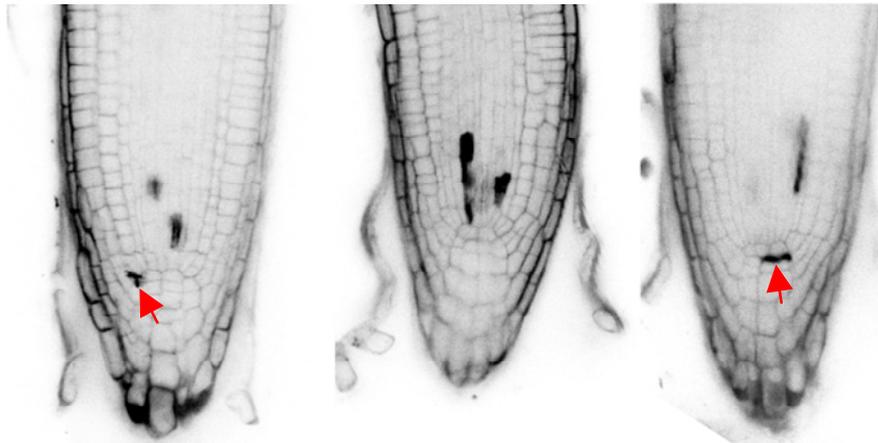
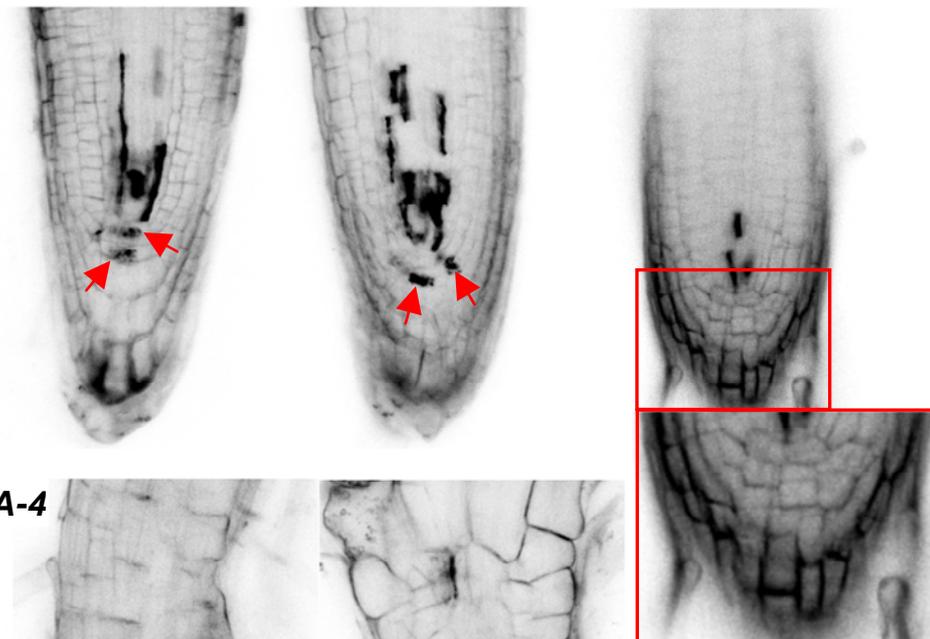
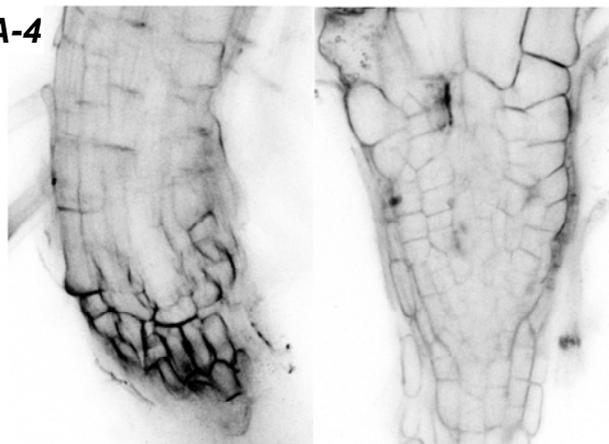
*recq4A-4**rtel1-1**rtel1-1 recq4A-4*

Abbildung 3.19: Zelltod in *rtel1-1 recq4A-4* nach *cis*-Platin-Behandlung. Legende auf nächster Seite.

Abbildung 3. 19: Zelltod in *rtel1-1 recq4A-4* nach *cis*-Platin-Behandlung. Abb. auf vorheriger Seite.

Die Wurzeln der Mutantenlinien und des Wildtyps (WT) wurden nach *cis*-Platin-Behandlung mit Propidiumiodid gefärbt und mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Nach *cis*-Platin-Behandlung (35 μ M) wies das Wurzelmeristem des Wildtyps mehrere tote vaskuläre Stammzellen und TA-Zellen auf. Die SZN wurde farblich markiert. Die Einzelmutante *recq4A-4* reagierte hypersensitiv auf *cis*-Platin, was in Zelltod resultierte. Die Einzelmutante *rtel1-1* zeigte neben den tote TA-Zellen und toten vaskuläre Stammzellen im Grundzustand zudem andere tote Stammzellen (rote Pfeile) und Wurzeln mit veränderter SZN (roter Kasten). Da *rtel1-1 recq4A-4* bereits im Grundzustand schwere Defekte in der Wurzelmorphologie aufwies, konnte nach *cis*-Platin-Behandlung keine Steigerung des Phänotyps beobachtet werden. rot: Ruhezentrum (QC); dunkelblau: vaskuläre Stammzellen; hellblau: Kortex-/Endodermisstammzellen; grün: Stammzellen der Epidermis/lateralen Wurzelhaube; gelb: Collumella-Stammzellen.

rtel1-1 fancm1-1

In den Linien *rtel1-1 fancm1-1* und in den entsprechenden Einzelmutanten wurde ebenfalls der Zelltod im Wurzelmeristem im Grundzustand und nach *cis*-Platin-Behandlung untersucht. Die Mutantenlinie *fancm1-1* hatte eine ähnlich hohe Rate an Wurzeln mit toten Zellen wie der Wildtyp. In der Doppelmutante wurden mehr Wurzeln mit toten vaskulären Stammzellen und toten TA-Zellen festgestellt als in der *rtel1-1* Einzelmutante. Zudem wurden mehr Wurzeln beobachtet, in denen andere Stammzellen abgestorben waren ($\sim 5\%$) und es wurden vermehrt Wurzeln mit einer veränderten SZN beobachtet ($\sim 26\%$; Abbildung 3.21). Im Vergleich zum Grundzustand wurde nach *cis*-Platin-Induktion in allen Linien eine Zunahme der Wurzeln mit toten Stammzellen festgestellt. Im Vergleich zum Wildtyp konnte in *fancm1-1* keine erhöhte Rate an Wurzeln mit toten vaskulären Stammzellen festgestellt werden. Allerdings war die Anzahl der Wurzeln mit toten TA-Zellen erhöht. Zudem konnten in *fancm1-1* zusätzlich Wurzeln mit anderen toten Stammzellen identifiziert werden. In der Doppelmutante wiesen alle untersuchten Wurzeln mindestens eine tote vaskuläre Stammzelle und eine tote TA-Zelle auf. Auch die Anzahl der Wurzeln mit anderen toten Stammzellen ($\sim 54\%$) nahm im Vergleich zu beiden Einzelmutanten zu. Die Anzahl der Wurzeln mit veränderter SZN blieb nach *cis*-Platin-Induktion vergleichbar mit der Rate in *rtel1-1*. Die insgesamt erhöhte Rate an toten Zellen im Wurzelmeristem von *rtel1-1 fancm1-1* nach *cis*-Platin-Behandlung bestätigte die bereits zuvor beschriebene Hypersensitivität der Doppelmutante gegenüber CLs (Abschnitt 3.1.6 und Abbildung 3.22).

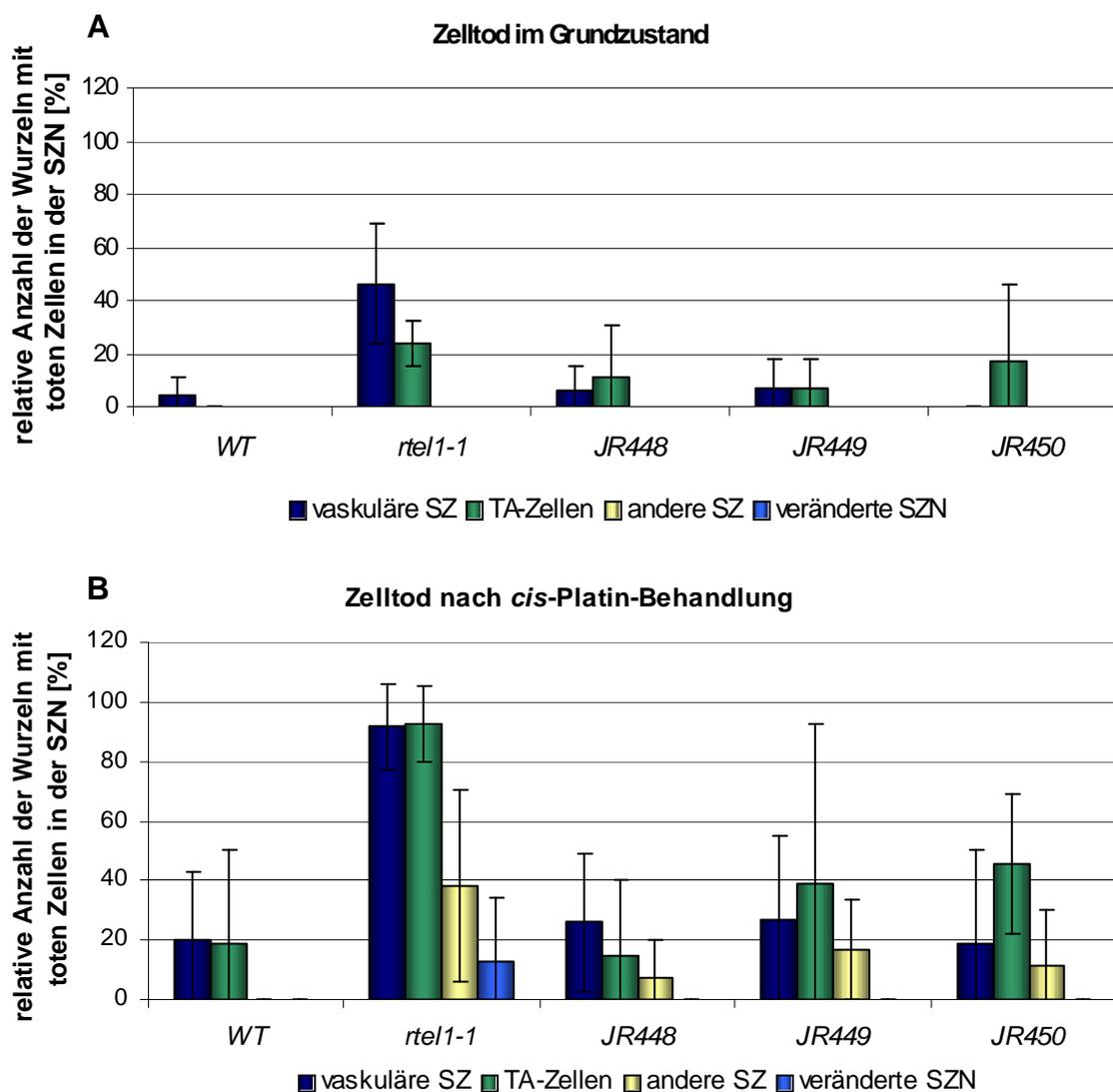


Abbildung 3.20: Zelltod im Wurzelmeristem. Die Wurzeln wurden mit Propidiumiodid gefärbt und der Zelltod in der Stammzellnische (SZN) mittels Konfokalmikroskopie ausgewertet. Die Häufigkeit von Wurzeln, in denen mindestens eine tote Zelle in der SZN gezählt wurde, wurde in Relation zu allen untersuchten Wurzeln einer Linie gesetzt. Dabei wurde zwischen toten vaskulären Stammzellen (SZ), toten TA-Zellen, anderen toten Stammzellen und einer veränderten SZN unterschieden. **A)** Im Grundzustand war in der Mutantenlinie *rtl1-1* die Anzahl an Wurzeln mit toten TA-Zellen beziehungsweise toten vaskulären SZ im Vergleich zum WT und den Komplementationslinien (JR448, JR449, JR450) erhöht. **B)** Nach *cis*-Platin-Behandlung (35 μ M) wurden zudem Wurzeln mit anderen toten SZ sowie einer veränderten SZN beobachtet. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung.

rtl1-1 mus81-1

Auch im Fall von *mus81-1* und der Doppelmutante *rtl1-1 mus81-1* korreliert die gemessene Wurzellänge mit dem Ausmaß an toten Zellen in der SZN. Neben einer vergleichbaren Rate an Wurzeln mit toten vaskulären Stammzellen beziehungsweise toten TA-Zellen in beiden Einzelmutanten wurde in *mus81-1* außerdem eine erhöhte Anzahl von Wurzeln mit anderen toten

Stammzellen festgestellt. Des Weiteren wurden $\sim 10\%$ mehr Wurzeln mit veränderter SZN als bei *rtel1-1* gefunden. In der Doppelmutante wiesen $\sim 40\%$ eine veränderte SZN auf. Die Anzahl der Wurzeln mit toten vaskulären Stammzellen beziehungsweise toten TA-Zellen belief sich auf $\sim 75\%$ beziehungsweise 95% . Die Rate der Wurzeln mit anderen toten Stammzellen war vergleichbar mit der Rate in *mus81-1* (Abbildung 3.21). Die für *mus81-1* postulierte Hypersensitivität gegenüber *cis*-Platin (Berchowitz *et al.*, 2007) konnte mit diesem Experiment bestätigt werden.

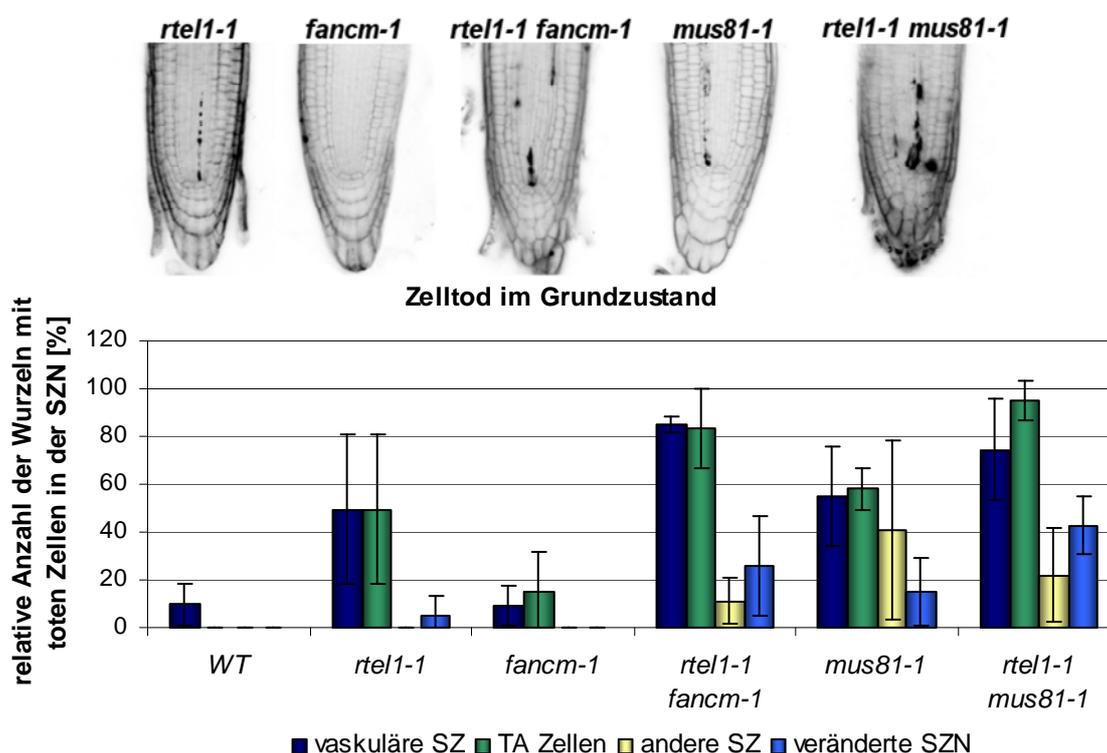


Abbildung 3.21: Zelltod im Wurzelmeristem im Grundzustand. Die Wurzeln wurden mit Propidiumiodid gefärbt und der Zelltod in der Stammzellnische (SZN) mittels Konfokalmikroskopie ausgewertet. Die Häufigkeit von Wurzeln, in denen mindestens eine tote Zelle in der SZN gezählt wurde, wurde in Relation zu allen untersuchten Wurzeln einer Linie gesetzt. Dabei wurde zwischen toten vaskulären Stammzellen (SZ), toten TA-Zellen, anderen toten Stammzellen (SZ) und einer veränderten SZN unterschieden. Für die Linien *rtel1-1*, *fancm-1*, *rtel1-1 fancm-1*, *mus81-1* und *rtel1-1 mus81-1* wurde jeweils eine Wurzel exemplarisch abgebildet (oben). Ein Unterschied zwischen Wildtyp (WT) und *fancm-1* konnte nicht festgestellt werden. Die Anzahl an Wurzeln mit toten Zellen war in der Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* höher als in *rtel1-1*. Zudem wurden häufiger Wurzeln mit anderen toten Stammzellen sowie einer veränderten SZN beobachtet. In *mus81-1* wurden neben toten vaskulären Stammzellen und toten TA-Zellen vermehrt andere tote Stammzellen und eine veränderte SZN festgestellt. In der Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* war die Rate an Wurzeln mit toten Zellen höher als in beiden Einzelmutanten. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung (unten).

Nach *cis*-Platin-Behandlung wurden in *mus81-1* mehr Wurzeln mit toten Stammzellen und einer veränderten SZN beobachtet als im Wildtyp. Ein Unterschied zwischen den Einzelmutanten *rtel1-1* und *mus81-1* konnte nicht festgestellt werden. Ähnlich wie in *rtel1-1 fancm-1* wiesen in der Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* alle untersuchten Wurzeln mindestens eine tote vaskuläre Stammzelle und eine tote TA-Zelle auf. Die Rate der Wurzeln mit anderen toten Stammzellen sowie mit einer veränderten SZN war höher als in beiden Einzelmutanten. Die bereits zuvor beschriebene Hypersensitivität gegenüber CLs konnte für *rtel1-1 mus81-1* bestätigt werden (Abschnitt 3.1.6 und Abbildung 3.22).

3.1.10 Die Funktion von *AtRTEL1* in der Telomerstabilität

Sowohl im Menschen als auch in Mäusen hat der Verlust von RTEL1 schwerwiegende Folgen für den Telomererhalt. In Mauszellen konnte gezeigt werden, dass RTEL1 für eine korrekte Auflösung von T-Loops essentiell ist und G4-DNA-Strukturen entgegenwirkt. Der Verlust von RTEL1 resultiert in einer rapiden Verkürzung der Telomere (Ding *et al.*, 2004; Vannier *et al.*, 2012). Im Menschen verursacht die Mutation von *RTEL1* die Erbkrankheit Hoyerall-Hreidarsson Syndrom. Die Patienten weisen ebenfalls verkürzte Telomere auf (Ballew *et al.*, 2013b; Le Guen *et al.*, 2013; Lee, 2013; Walne *et al.*, 2013).

Um die Funktion von RTEL1 beim Erhalt der Telomerintegrität in *A. thaliana* zu untersuchen, wurde die Mutantenlinie *rtel1-1* zunächst mit der Telomerase-Mutante *tert* gekreuzt. Der Defekt von *TERT* verursacht in *A. thaliana* eine rapide kontinuierliche Verkürzung der Telomere. Nach der fünften Generation lassen sich die ersten Defekte in der Blattmorphologie beobachten. Diese Wuchsdefekte und undifferenzierten Wucherungen nehmen in jeder Folgegeneration zu. Nach zehn bis elf Generationen kommt die Entwicklung letztendlich zum Erliegen und es können keine lebenden Nachkommen mehr gebildet werden (Riha *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entwicklung der Doppelmutante über mehrere Generationen hinweg beobachtet und dokumentiert. Damit die Telomere von *tert* nicht schon zu Beginn dieses Experiments verkürzt waren, wurden die Linien im heterozygoten Zustand gekreuzt. In der F2-Generation wurden neben der homozygoten Doppelmutante, auch die homozygoten Einzelmutanten sowie der Wildtyp durch PCR-basierte Genotypisierung bestimmt. Diese Pflanzen entsprachen der Startgeneration der jeweiligen Linie und wurden über mehrere Generationen hinweg vermehrt. In der F3-Generation wurden in den Mutantenlinien keine Abweichungen von der Wildtyp-Generation beobachtet. Die Pflanzen wuchsen normal und produzierten eine adäquate Menge an Samen. In der F4-Generation konnten auch keine Auffälligkeiten festgestellt werden.

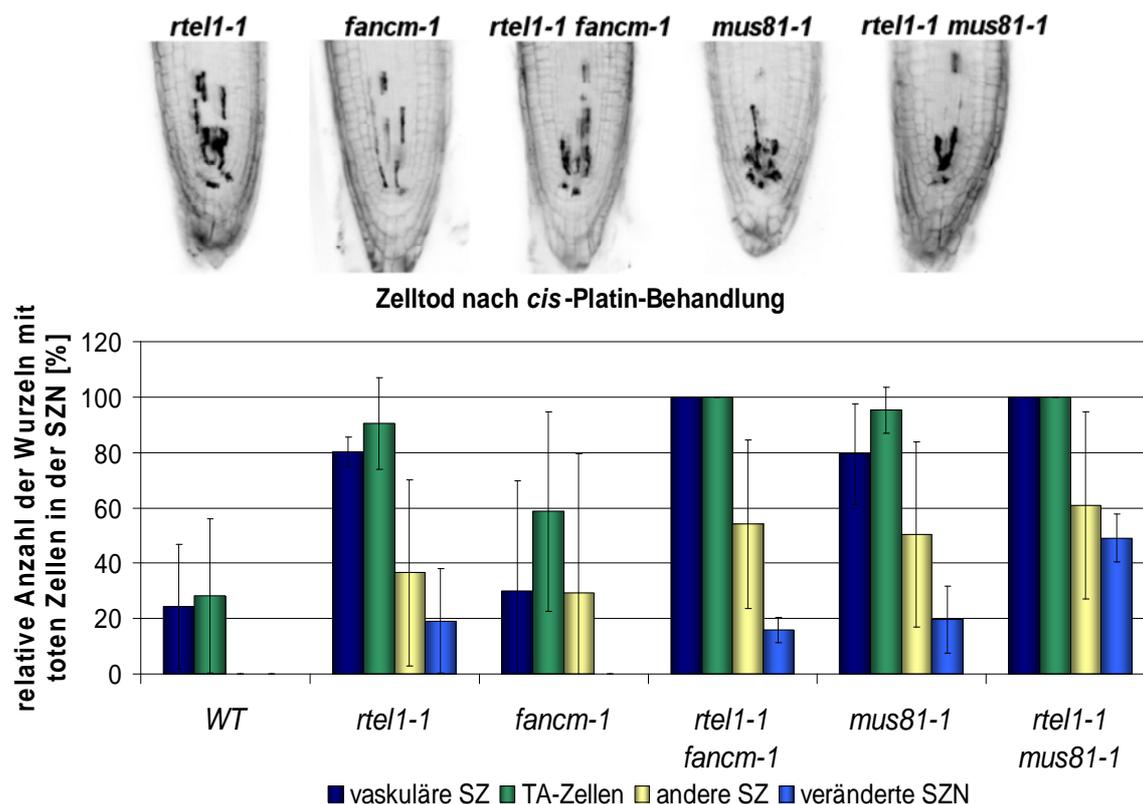


Abbildung 3.22: Zelltod im Wurzelmeristem nach *cis*-Platin-Behandlung. Die Wurzeln wurden mit Propidiumiodid gefärbt und der Zelltod in der Stammzellnische (SZN) nach Behandlung der Pflanzen mit *cis*-Platin (35 μ M) mittels Konfokalmikroskopie ausgewertet. Die Häufigkeit von Wurzeln, in denen mindestens eine tote Zelle in der SZN gezählt wurde, wurde in Relation zu allen untersuchten Wurzeln einer Linie gesetzt. Dabei wurde zwischen toten vaskulären Stammzellen (SZ), toten TA-Zellen, anderen toten Stammzellen (SZ) und einer veränderten SZN unterschieden. Für die Linien *rtel1-1*, *fancm-1*, *rtel1-1fancm-1*, *mus81-1* und *rtel1-1 mus81-1* wurde jeweils eine Wurzel exemplarisch abgebildet (oben). Im Gegensatz zum Wildtyp (WT) wies *fancm-1* nach *cis*-Platin-Behandlung Wurzeln mit anderen toten Stammzellen auf. In *rtel1-1 fancm-1* war die Anzahl an Wurzeln mit toten Zellen höher als in *rtel1-1*. In allen Wurzeln konnte mindestens eine tote vaskuläre sowie mindestens eine tote TA-Zelle festgestellt werden. Zudem wurden häufiger Wurzeln mit anderen toten Stammzellen sowie einer veränderten SZN beobachtet. Die Einzelmutante *mus81-1* reagierte ebenfalls hypersensitiv auf *cis*-Platin. In der Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* hatten alle untersuchten Wurzeln mindestens eine tote vaskuläre Stammzelle und mindestens eine tote TA-Zelle. Zudem wurden sehr häufig Wurzeln mit einer veränderten SZN festgestellt. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung (unten).

Die F5-Generation vom Wildtyp und der beiden Einzelmutanten verlief ebenfalls ähnlich. In der Doppelmutante wurden jedoch schwere Wuchsdefekte festgestellt. Die Pflanzen zeigten Wucherungen, eine geänderte Blatt- und Sprossmorphologie und erreichten nur eine geringe Größe. Im Gegensatz zur Mutantenlinie *tert*, deren Entwicklung erst nach zehn bis elf Generationen zum Erliegen kam, war die Doppelmutante bereits in vierten homozygoten Generation (F5) steril und die Pflanzenentwicklung kam in dieser Generation zum Erliegen. (Abbildung 3.23).

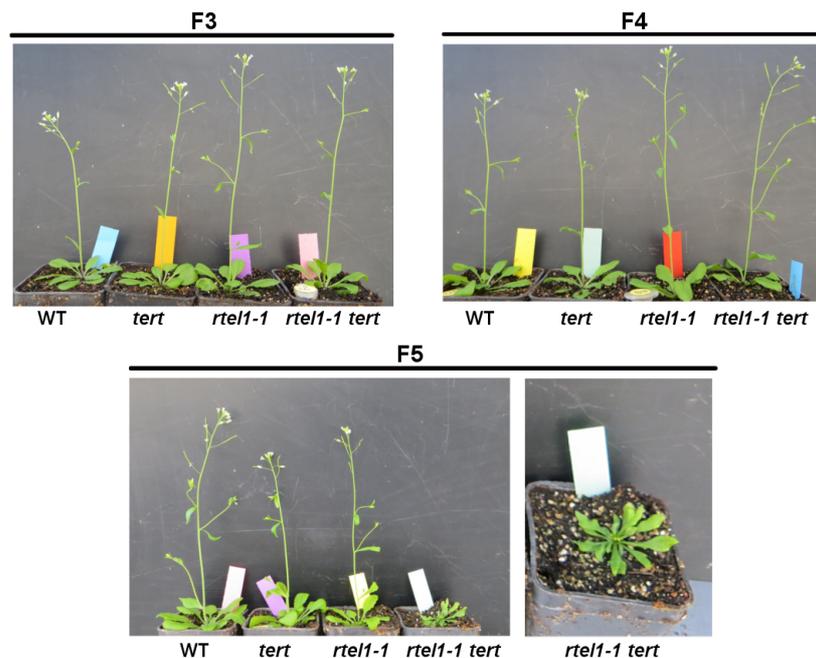


Abbildung 3.23: Entwicklung von *rtel1-1 tert*. Die Doppelmutante *rtel1-1 tert* wurde durch Kreuzung erzeugt und die Entwicklung über mehrere Generationen beobachtet. In der F3- und F4-Generation entwickelten sich die Einzelmutanten *rtel1-1* und *tert* sowie die entsprechende Doppelmutante ähnlich wie der Wildtyp (WT). In der F5-Generation wurden bei der Doppelmutante deutliche Wuchsdefekte beobachtet. Die Pflanzen blieben klein und produzierten keine Samen.

In der F5-Generation der Doppelmutante *rtel1-1 tert* wurden ebenfalls die Wurzeln untersucht und mit den Einzelmutanten sowie dem Wildtyp verglichen. Da in der F4-Generation noch keine Entwicklungsdefekte zwischen den verschiedenen Linien beobachtet wurde, wurde auch diese Generation genauer untersucht und mit der F5-Generation verglichen.

Zunächst wurde die durchschnittliche Wurzellänge der Linien bestimmt. In der F4-Generation war die Wurzellänge von *tert* nach sieben Tagen Anzucht vergleichbar mit der des Wildtyps. Die Wurzeln von *rtel1-1* waren, wie erwartet, kürzer als die vom Wildtyp. Die durchschnittliche Wurzellänge der Doppelmutante entsprach der von *rtel1-1*. Für die Einzelmutante *tert* und den Wildtyp konnte kein Unterschied zwischen F4- und F5-Generation bezüglich der Wurzellänge festgestellt werden. Die Wurzeln von *rtel1-1* waren in der F4- und F5-Generation ebenfalls vergleichbar lang. Die Wurzeln der Doppelmutante wuchsen sehr langsam. Nach sieben Tagen Anzucht der F5-Generation waren die Wurzeln von *rtel1-1 tert* deutlich kürzer als die des Wildtyps und der Einzelmutanten (Abbildung 3.24).

Des Weiteren wurde der Zelltod im Wurzelmeristem im Grundzustand und nach *cis*-Platin-Behandlung untersucht und auf die gleiche Weise ausgewertet, wie in Abschnitt 3.1.9 beschrieben wurde. Sowohl in der F4- als auch in der F5-Generation konnte im Grundzustand kein Unterschied zwischen WT und *tert* in der Wurzelentwicklung festgestellt werden. In beiden

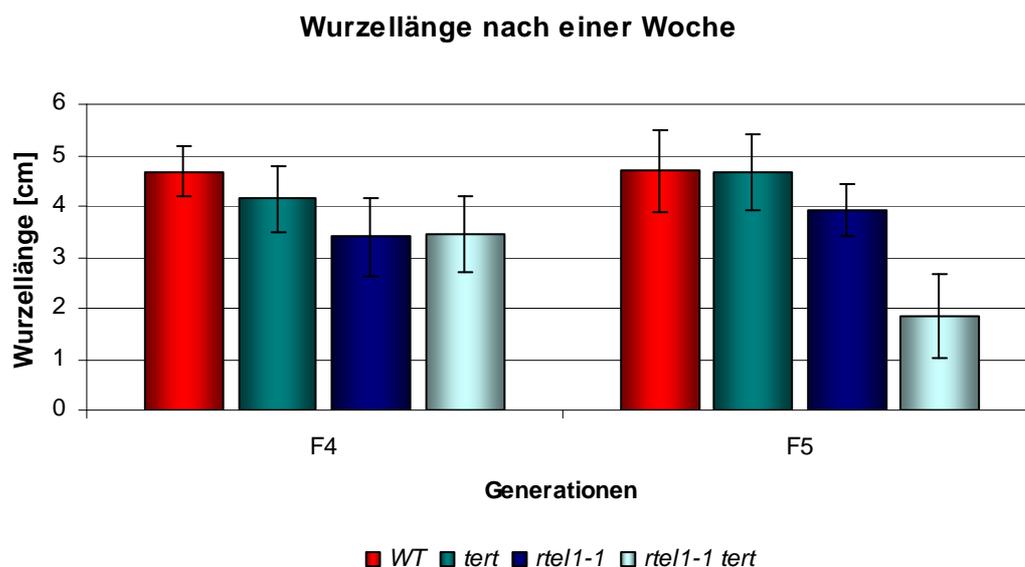


Abbildung 3.24: Wurzellänge in *rtel1-1 tert*. Nach einer Woche Anzucht wurde mit Hilfe von SmartRoot die Wurzellänge vom Wildtyp (WT), *rtel1-1*, *tert* und der entsprechenden Doppelmutante gemessen. Dabei wurden sowohl die Wurzellänge der F4- als auch der F5-Generation bestimmt. Sowohl in der F4 als auch in der F5 war die Wurzellänge der Einzelmutante *tert* vergleichbar mit dem Wildtyp. Die Doppelmutante *rtel1-1 tert* wies in der F4 vergleichbar lange Wurzeln mit *rtel1-1* auf. In der F5 waren die Wurzeln der Doppelmutante deutlich kürzer als die der Einzelmutanten und des Wildtyps. Pro Linie wurde die durchschnittliche Wurzellänge aus mindestens 30 Wurzeln berechnet und als Säulen dargestellt. Die Balken entsprechen der Standardabweichung.

Linien gab es nur wenige Wurzeln, die mindestens eine tote Stammzelle beziehungsweise eine tote TA-Zelle aufwiesen. In der F4-Generation war die Anzahl der Wurzeln mit mindestens einer toten Stammzelle in *rtel1-1 tert* vergleichbar mit der Anzahl der Wurzeln in der *rtel1-1* Einzelmutante. In der F5-Generation war die Rate an Wurzeln mit mindestens einer toten Stammzelle in der Doppelmutante insgesamt höher als in der *rtel1-1*. Weiterhin wurden sowohl in der F4 als auch F5 vermehrt veränderte SZN festgestellt als in der entsprechenden *rtel1-1* Einzelmutante. Nach *cis*-Platin-Behandlung zeigten alle Linien beider Generationen einen höhere Zelltodrate als im Grundzustand. In der Doppelmutante wies jede untersuchte Wurzel eine veränderte SZN auf (Abbildung 3.25 und Abbildung 3.26).

Um die Auswirkung der Mutationen auf den Telomererhalt über die Generationen hinweg genauer zu analysieren, wurden mittels Southern Blot die terminalen Restriktions-Fragmente (*terminal restriction fragments*, TRFs) der Doppelmutante *rtel1-1 tert* untersucht und mit denen der Einzelmutanten beziehungsweise des Wildtyps in der F3- und F4-Generation verglichen. Dazu wurde die genomische DNA der verschiedenen Linien extrahiert, mit dem Restriktionsenzym *AblI* verdaut und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Bestimmung der Telomerlänge erfolgte die Hybridisierung mit einem 5'-markierten (T₃AG₃)₄-Oligonukleotid als Sonde. In

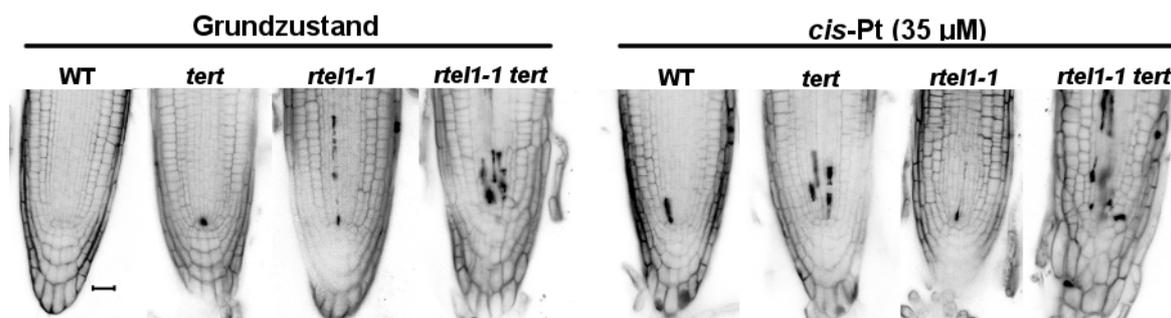


Abbildung 3.25: Zelltod im Wurzelmeristem von *rtel1-1 tert* (F5-Generation). Die Wurzeln der Mutantenlinien und des Wildtyps (WT) wurden in der F5-Generation mit Propidiumiodid gefärbt und mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Im Grundzustand zeigte das Wurzelmeristem des Wildtyps (WT) nur selten tote Zellen. In *tert* wurden ebenfalls nur wenige tote Stammzellen beobachtet. Die Einzelmutante *rtel1-1* zeigte vermehrt tote TA-Zellen sowie tote vaskuläre Stammzellen. Andere tote Stammzellen wurden kaum beobachtet. Die Doppelmutante zeigte eine erhöhte Rate an Wurzeln mit toten Stammzellen als beide Einzelmutanten. Nach *cis*-Platin-Behandlung (35 µM) konnte in allen Linien eine höhere Rate an Wurzeln mit toten Stammzellen festgestellt werden als im Grundzustand. In der Doppelmutante war der Aufbau der SZN nahezu in jeder Wurzel stark verändert.

A. thaliana konnte bereits gezeigt werden, dass ein Verlust der Telomerase in einer kontinuierlichen Verkürzung der Telomere über die Generationen hinweg resultiert (Riha *et al.*, 2001). Die TRF-Analyse in dieser Arbeit konnte diese Ergebnisse bestätigen. Von der F3 bis zur F4 verkürzten sich die Telomere und waren mit 2,5 kb in der F3 beziehungsweise 1,2 kb in der F4-Generation kürzer als die Telomere der entsprechenden Wildtyp-Generation. Für die Einzelmutante *rtel1-1* wurden in der F3- sowie in der F4-Generation längere TRFs als im Wildtyp detektiert. Die von *rtel1-1* waren circa 5 kb und die vom Wildtyp circa 4 kb. In der Doppelmutante *rtel1-1 tert* kam es bereits in der F3 zu einem rapiden Telomerverlust und es konnten schon in der F3 keine TRFs mehr detektiert werden (Abbildung 3.27).

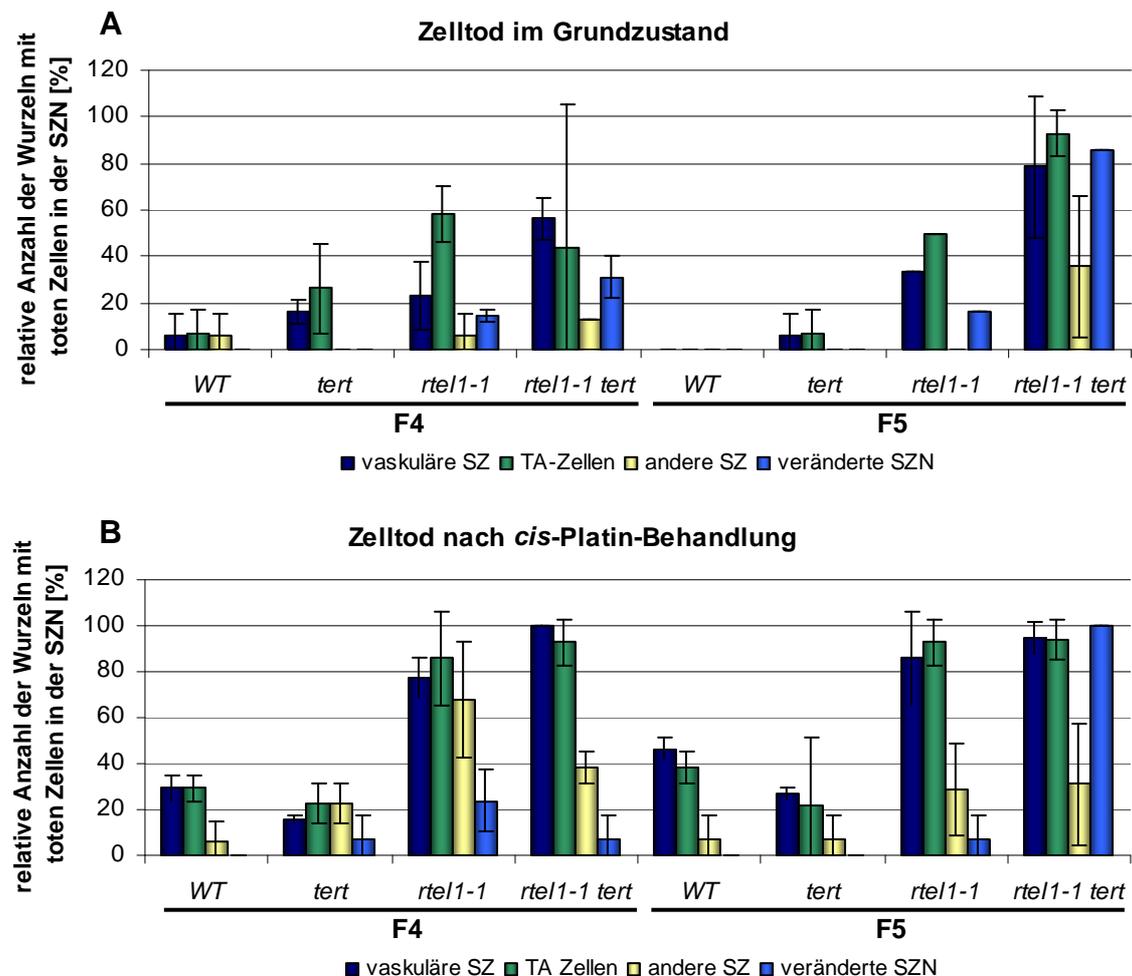


Abbildung 3.26: Zelltod im Wurzelmeristem von *rtel1-1 tert*. Die Wurzeln wurden mit Propidiumiodid gefärbt und der Zelltod in der Stammzellnische (SZN) mittels Konfokalmikroskopie ausgewertet. Die Häufigkeit von Wurzeln, in denen mindestens eine tote Zelle in der SZN gezählt wurde, wurde in Relation zu allen untersuchten Wurzeln einer Linie gesetzt. Dabei wurde zwischen toten vaskulären Stammzellen (SZ), toten TA-Zellen, anderen toten Stammzellen und einer veränderten SZN unterschieden. **A)** Zelltod im Grundzustand. Ein Unterschied zwischen Wildtyp (WT) und *tert* konnte weder in der F4- noch in der F5-Generation festgestellt werden. Die Anzahl an Wurzeln mit toten Zellen war in der F4 der Doppelmutante *rtel1-1 tert* vergleichbar mit der Anzahl in der Einzelmutante *rtel1-1*. Es wurden jedoch häufiger Wurzeln mit einer veränderten SZN beobachtet. In der F5 wurden in der Doppelmutante insgesamt mehr Wurzeln mit toten Stammzellen als in der *rtel1-1* Einzelmutante festgestellt. Die Anzahl an Wurzeln mit einer veränderten SZN war stark erhöht. **B)** Nach *cis*-Platin-Behandlung (35 μ M) war die Menge an toten Stammzellen in allen Linien höher als im entsprechenden Grundzustand. In der F5 von *rtel1-1 tert* wiesen alle untersuchten Wurzeln eine veränderte SZN auf. Die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen wurden als Säulen dargestellt, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

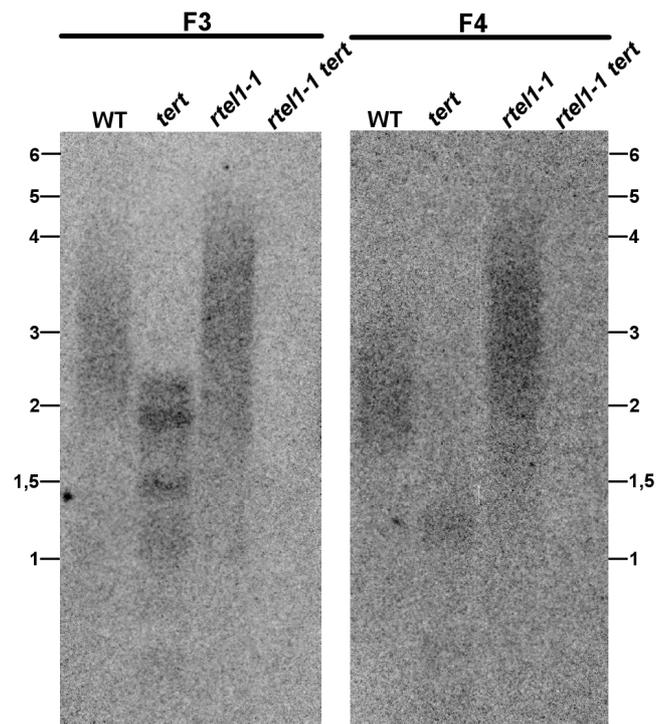


Abbildung 3.27: TRF-Analyse in *rtel1-1*. In der F3- und F4-Generation von *rtel1-1*, *tert*, der Doppelmutante *rtel1-1 tert* und des Wildtyps wurden jeweils 1 μ g genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *AluI* verdaut und mittels Southern Blot analysiert. Zur Bestimmung der Telomerlänge diente die Hybridisierung mit einer 5'-markierten $(T_3AG_3)_4$ -Sonde. Sowohl in der F3 als auch der F4 waren die TRFs vom Wildtyp etwa 4 kb groß. Die von *rtel1-1* waren mit 5 kb größer als die des Wildtyps. In der *tert* Einzelmутante konnte über die Generationen hinweg eine Verkürzung der TRFs festgestellt werden. In der F3 wurden Fragmente von 2,5 kb detektiert, in der F4 wurde ein schwaches Signal bei 1,2 kb detektiert. In der Doppelmutante *rtel1-1 tert* kam es bereits in der F3 zum Telomerverlust, sodass kein Signal detektiert werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Die DNA-Helikase RTEL1 in *A. thaliana*

Die HR ist ein wichtiger Prozess in sich teilenden Zellen. In der Mitose wird sie unter anderem für die Reparatur von DSBs und für die Wiederaufnahme von stehengebliebenen Replikationsgabeln benötigt. In der Meiose spielt die HR ebenfalls eine wichtige Rolle und ermöglicht die korrekte Verteilung der homologen Chromosomen und die Neukombination der Erbinformation. Eine inadäquate HR kann jedoch zu einer fehlerhaften Chromosomenverteilung sowie zu nicht aufgelösten Rekombinationsintermediaten führen. Genominstabilität und Krebs wären die Folgen. Daher ist eine strenge Regulation der HR und Koordination mit anderen Prozessen, wie der Replikation, in der Zelle enorm wichtig.

Für die Regulation der HR werden eine Vielzahl an Proteinen benötigt. In Hefe wird die HR unter anderem durch SRS2 reguliert. Diese Antirekombinase wirkt der CO-Bildung entgegen, indem sie D-Loop-Rekombinationsintermediate abbaut und die Reparatur mittels SDSA fördert (Veaute *et al.*, 2003). SRS2 ist allerdings nicht in allen Eukaryoten konserviert. In *C. elegans* ergaben Untersuchungen des RTEL1-Homologs, dass diese DNA-Helikase eine weitere Antirekombinase darstellt. Da der Verlust von *CeRTEL1* und der Verlust von *ScSRS2* in einem ähnlichen Phänotyp resultieren, wurde RTEL1 als funktionelles Analogon von SRS2 beschrieben (Barber *et al.*, 2008). In Mäusen und im Menschen ist RTEL1 wichtig für die Telomerhomöostase (Vannier *et al.*, 2012; Ballew *et al.*, 2013b). In dieser Arbeit wurde die Funktion von RTEL1 in der HR, der DNA-Reparatur sowie in der Telomerstabilität in *A. thaliana* analysiert.

4.1.1 Die Eisen-Schwefel-Domäne in RTEL1

Mit Hilfe von Sequenzanalysen konnten in den RTEL1-Homologen im Menschen und in Mäusen Eisen-Schwefel-Domänen identifiziert werden. Aufgrund dieser Domäne wird die Helikase RTEL1 in eine Helikasefamilie mit XPD, FANCI beziehungsweise CHL1 zusammengefasst (Rudolf *et al.*, 2006). Die Eisen-Schwefel-Domäne befindet sich bei allen bisher untersuchten Organismen zwischen dem Walker A- und Walker B-Motiv. Eines der Hauptmerkmale der Eisen-Schwefel-Domäne sind vier konservierte Cystein-Reste, welche ein Eisen-Schwefel Cluster bilden. Für die Helikase-Aktivität ist die Funktion der Eisen-Schwefel-Domäne in den untersuchten Helikasen essentiell (Rudolf *et al.*, 2006). In Hefe resultiert der Verlust der Eisen-Schwefel-Domäne von RAD3 (XPD-Homolog) in einer Hypersensitivität gegenüber UV-Strahlung. Im Menschen konnten Mutationen in der Eisen-Schwefel-Domäne von FANCI und XPD ebenfalls mit einem Verlust der Helikaseaktivität und den daraus resultierenden Krankheiten Fanconi Anämie beziehungsweise Trichothiodystrophie in Verbindung gebracht werden (Rudolf *et al.*, 2006).

Mit Hilfe eines Sequenzabgleichs von *Ar*RTEL1 mit den bereits bekannten konservierten Eisen-Schwefel-Domänen dieser Helikasefamilie konnten auch in *Ar*RTEL1 die vier charakteristischen Cystein-Reste identifiziert werden (Abbildung 3.2). Die Eisen-Schwefel-Domäne ist demnach auch im pflanzlichen RTEL1-Homolog konserviert und es ist anzunehmen, dass sie dort ebenfalls essentiell für die Helikaseaktivität ist.

4.1.2 Expressionsanalysen in *rtel1-1*

Zur Untersuchung der Funktion von RTEL1 in *A. thaliana* stand nur eine T-DNA Insertionslinie zur Verfügung. Bei dieser Mutantenlinie *rtel1-1* (SALK_113285) konnte eine Mehrfachinsertion in Exon 7 identifiziert werden. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass trotz T-DNA Insertion Bereiche von *Ar*RTEL1 exprimiert werden.

Mittels quantitativer *real-time* PCR konnte gezeigt werden, dass in der Mutantenlinie *rtel1-1* 5' der T-DNA die Expression von RTEL1 mit der vom Wildtyp vergleichbar war. Über den T-DNA Insertionsort hinweg und 3' der T-DNA erfolgte nahezu keine Expression (Abbildung 3.3). Die Expressionsanalyse 5' der T-DNA zeigt, dass in der Mutantenlinie noch ein Teiltranskript hergestellt wird. Weiterhin kann durch die geringe Expression über den T-DNA Insertionsort und 3' der T-DNA eine Bildung vollständiger Transkripte nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die Transkription von RTEL1 in der Mutantenlinie stark von der im Wildtyp abweicht. Da mit dieser Methode jedoch keine Aussage auf Proteinebene getroffen werden kann, ist es möglich, dass es in *rtel1-1* zur Bildung eines

Restproteins des N-terminalen Bereichs von RTEL1 kommt. Das Resultat wäre ein stark verkürztes Protein mit keiner oder einer nur stark eingeschränkten Funktion. Es wäre dennoch möglich, dass dieses Teilprotein die normalen Reparaturmechanismen interferiert und damit den abweichenden Phänotyp in der Mutantenlinie *rtel1-1* auslösen würde. Eine Möglichkeit den negativen Effekt eines Teilproteins auszuschließen, wäre die Untersuchung weiterer *ArTEL1* T-DNA Insertionsmutanten. Wären die negativen Auswirkungen eines Restproteins für den Phänotyp der Mutantenlinie verantwortlich, so würden die anderen Mutantenlinien einen abweichenden Phänotyp aufweisen. Zur Untersuchung der Rolle von *ArRTEL1* stand allerdings keine weitere Mutante zur Verfügung. Zur Feststellung, ob die untersuchten Defekte tatsächlich auf die Mutation des *RTEL1*-Gens zurückzuführen waren, wurden daher gleichzeitig Komplementationsanalysen mit dem *RTEL1*-Wildtypkonstrukt durchgeführt.

4.1.3 Die Rolle von *ArRTEL1* in der somatischen homologen Rekombination

Zur Überprüfung, ob *RTEL1* in *A. thaliana* ebenfalls als Antirekombinase wirkt und der HR entgegenwirkt, wurde die Rekombinationsrate der Mutantenlinie *rtel1-1* bestimmt und mit der des Wildtyps verglichen. Für diese Untersuchungen wurde das Reporterkonstrukt IC9 verwendet (Molinier *et al.*, 2004). Durch die Restaurierung eines funktionellen *GUS*-Gens kann die Rekombinationsrate nach histochemischer Färbung anhand blauer Sektoren quantifiziert werden. Die HR-Rate von *rtel1-1* war im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht (Abbildung 3.5). Im Rahmen dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass *ArRTEL1* eine HR-unterdrückende Wirkung hat. In *C. elegans* ist bekannt, dass *RTEL1* der HR entgegenwirkt, in dem es D-Loop Rekombinationsintermediaten entgegenwirkt (Barber *et al.*, 2008). Es ist vorstellbar, dass *ArRTEL1* eine vergleichbare Rolle in der HR von *A. thaliana* einnimmt und als Antirekombinase D-Loop Rekombinationsintermediate auflöst und so die Rekombination mittels SDSA fördert.

Wie bereits erwähnt, stand zur Untersuchung der Rolle von *RTEL1* in *A. thaliana* nur eine Mutante zur Verfügung. Es war nicht möglich die HR-unterdrückende Wirkung in anderen *rtel1*-Mutantenlinien zu überprüfen. Da die Expressionsanalysen zeigten, dass die Bildung eines Teilproteins möglich wäre, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dieses enorm verkürzte Protein für die abweichende HR-Rate in der Zelle verantwortlich war. Zudem konnten eine Mehrfachintegration der T-DNA im Genom sowie eine Translokation nicht ausgeschlossen werden. Durch die Komplementation der Mutantenlinie *rtel1-1* mit dem *RTEL1*-Wildtypkonstrukt wurde überprüft, ob die erhöhte HR-Rate tatsächlich aus einem Verlust von *RTEL1* resultierte. In den Komplementationslinien war die HR-Rate wieder auf Wildtypniveau (Abbildung 3.4). Dieses Ergebnis zeigte, dass ein Verlust von *RTEL1* die HR-Rate in der

Mutantenlinie erhöhte und dieser Phänotyp nicht etwa durch den negativen Einfluss eines Teilproteins oder durch einen Defekt in einem anderen Gen zustande kam, denn sonst wäre eine erfolgreiche Komplementation nicht möglich gewesen. Um herauszufinden, wie sich RTEL1 im Bezug auf andere Helikasen in *A. thaliana* verhält, wurden Epistasis-Analysen durchgeführt.

***At*RTEL1 und *At*SRS2 in der somatischen HR**

Da die Antirekombinase SRS2 nicht in allen Eukaryoten konserviert ist, wird angenommen, dass in diesen Organismen RTEL1 das funktionelle Analogon ist. Die Besonderheit von *A. thaliana* ist, dass in dieser Pflanze beide Antirekombinasen konserviert sind. Im Gegensatz zu *At*RTEL1 konnte für *At*SRS2 weder eine Funktion in der HR noch in der DNA-Reparatur nachgewiesen werden. Eine mögliche redundante Funktion der beiden Proteine war nicht auszuschließen. Zur Überprüfung der Redundanz wurde durch Kreuzung die Doppelmutante *rtel1-1 srs2-2* im IC9 Hintergrund hergestellt. Eine redundante Funktion konnte allerdings in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die Doppelmutante *rtel1-1 srs2-2* wies die gleiche HR-Rate wie die *rtel1-1* Einzelmutante auf. Es ist möglich, dass das Gen in *A. thaliana* keine Rolle in der Auflösung von Rekombinationsintermediaten spielt. Da jedoch *in vitro* bereits eine Helikaseaktivität für das SRS2-Homolog aus *A. thaliana* nachgewiesen wurde und gezeigt werden konnte, dass diese Helikase Rekombinationsintermediate, wie beispielsweise HJs mit Einzelstrangbruch, auflösen kann (Blanck *et al.*, 2009), ist es eher unwahrscheinlich, dass das Protein keinerlei Funktion bei der Auflösung von Rekombinationsintermediaten *in vivo* hat. Es ist anzunehmen, dass die Funktion durch eine weitere Helikase maskiert wird.

***At*RTEL1 und *At*FANCM in der somatischen HR**

Mit FANCM wurde ein weiteres Protein mit HR-supprimierender Wirkung in *A. thaliana* beschrieben. Der Verlust der Helikase/Tanslokase *At*FANCM resultiert in Hyperrekombination (Knoll *et al.*, 2012). Um zu untersuchen, ob RTEL1 und FANCM in einem gemeinsamen oder in unterschiedlichen Wegen zur Unterdrückung der HR wirken, wurde durch Kreuzung die Doppelmutanten *rtel1-1 fancm-1* im IC9 Hintergrund hergestellt. Die Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* hatte keinen vom Wildtyp abweichenden Wuchsphänotyp. Die Untersuchung der HR im IC9 Hintergrund war somit möglich. Im Vergleich zum Wildtyp war die HR-Rate in *fancm-1* leicht erhöht. Die HR-Rate war jedoch niedriger als in *rtel1-1*. Für die Doppelmutante konnte eine höhere HR-Rate als für beide Einzelmutanten festgestellt werden (Abbildung 3.6). Das deutet darauf hin, dass *At*RTEL1 und *At*FANCM zur Unterdrückung der HR in zwei parallelen Wegen arbeiten. Beim Verlust eines dieser Proteine, kann ein Teil der HR noch über den jeweils anderen Weg reguliert werden. Der gleichzeitige Verlust von *At*RTEL1 und *At*FANCM resultiert jedoch in einer noch höheren Hyperrekombination als in beiden Einzelmutanten. Durch diesen

additiven Effekt in der *rtel1-1 fancm-1* Doppelmutante lassen sich RTEL1 und FANCM in *A. thaliana* in zwei unterschiedliche Wege zur Unterdrückung der HR einordnen.

Weiterhin wurde in denselben Linien die HR-Rate nach DSB-Induktion durch Bleomycin getestet. Für FANCM konnte bereits ein gegensätzlicher Effekt bezüglich der HR in *A. thaliana* beschrieben werden: Während *AFANCM* spontane HR-Ereignisse unterdrückt, wirkt es nach einem DSB HR-fördernd (Knoll *et al.*, 2012). Da *rtel1-1* nach Bleomycin-Induktion eine signifikant geringere HR-Rate als der Wildtyp aufwies, ist davon auszugehen, dass *ARTEL1* ebenfalls eine HR-fördernde Wirkung nach DSB-Induktion hat. Interessanterweise verhielt sich die Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* bezüglich der HR-Rate nach Bleomycin-Induktion vergleichbar mit dem Wildtyp (Abbildung 3.7). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass beim gleichzeitigen Verlust von *ARTEL1* und *AFANCM* die Zelle einen anderen Rekombinationsweg wählt, der parallel zu den beiden Proteinen existiert.

Das unterschiedliche Verhalten der Mutantenlinien bei spontanen und durch DSB-Induktion verursachten HR-Ereignissen legte nahe, dass die spontanen HR-Ereignisse nicht durch DSBs ausgelöst werden, sondern durch andere Schäden. Sie sind wahrscheinlich auf HR-Ereignisse an der Replikationsgabel zurückzuführen. Untersuchungen der Mutantenlinie *fancm-1* in *A. thaliana* konnten diese Vermutung bereits bestätigen. Durch das *intrastrand-crosslink*-verursachende *cis*-Platin kann es zur Blockade an Replikationsgabeln kommen. Diese Schäden können während der Replikation unter anderem durch HR repariert werden. Nach *cis*-Platin-Induktion konnte in *fancm-1* eine höhere HR-Rate als im Grundzustand festgestellt werden. Daher ist anzunehmen, dass FANCM eine HR-supprimierende Funktion an Replikationsgabeln einnimmt (Knoll *et al.*, 2012). Die Ergebnisse in dieser Arbeit lassen eine ähnliche Funktion für *ARTEL1* vermuten. Es konnte gezeigt werden, dass nach *cis*-Platin-Induktion die HR-Rate von *rtel1-1* höher ist als die vom Wildtyp. Die HR-Rate der Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* war noch höher als die HR-Rate beider Einzelmutanten (Abbildung 3.7).

Zusammenfassend konnten diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei *ARTEL1* um eine Antirekombinase handelt, die Rekombinationsereignisse an Replikationsgabeln in einem vom *AFANCM* unabhängigen Weg unterdrückt.

***ARTEL1* und *ARECQ4A* in der somatischen HR**

Die RecQ-Helikase RECQ4A ist eine weitere Helikase in *A. thaliana* mit HR-supprimierender Wirkung (Hartung *et al.*, 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass der gleichzeitige Verlust von *AFANCM* und *ARECQ4A* zu einer höheren Rekombinationsrate führt als in beiden Einzelmutanten. RECQ4A und FANCM arbeiten demnach in zwei unabhängigen Wegen zur Unterdrückung der HR in *A. thaliana* (Knoll *et al.*, 2012). Um zu untersuchen, ob *ARTEL1* und

*At*RECQ4A ebenfalls in zwei parallelen Wegen agieren, wurde die Doppelmutante *rtel1-1 recq4A-4* durch Kreuzung hergestellt. Die Doppelmutante wies allerdings enorme Entwicklungsdefekte auf (Abbildung 3.16). Daher war die Untersuchung der somatischen HR von *rtel1-1 recq4A-4* mit diesem Rekombinationstest nicht möglich. Das sehr eingeschränkte Wachstum der Doppelmutante und die vom Wildtyp abweichende Blattmorphologie lassen den direkten Vergleich der HR-Rate mit der durchschnittlichen HR-Rate der Wildtyp-Pflanzen beziehungsweise der Einzelmutanten nicht zu. Die Tatsache, dass die Doppelmutante *rtel1-1 recq4A-4* solche schweren Defekte ausweist, ist jedoch sehr interessant und wird in Abschnitt 4.1.5 genauer diskutiert.

4.1.4 Die Rolle von *At*RTEL1 in der DNA-Reparatur

Sowohl für das RTEL1-Homolog in *C. elegans* als auch für das Analogon SRS2 in Hefe konnte eine Funktion in der Reparatur von ICLs nachgewiesen werden (Birrell *et al.*, 2002; Barber *et al.*, 2008). Weiterhin legen die Ergebnisse bezüglich der HR-Rate in dieser Arbeit eine Rolle von *At*RTEL1 an blockierten Replikationsgabeln nahe. Aus diesen Gründen wurde die Funktion von RTEL1 bei der Reparatur von CLs in *A. thaliana* untersucht. Dazu wurden die Pflanzen mit unterschiedlichen Konzentrationen MMC (5, 10, 15, 20 µg/ml) und *cis*-Platin (5/7,5/8,5/10 µM) behandelt. Während MMC hauptsächlich DNA-*interstrand-crosslinks* verursacht, treten durch *cis*-Platin vermehrt DNA-*intrastrand-crosslinks* auf.

4.1.4.1 *At*RTEL1 in der *interstrand-crosslink*-Reparatur

Für die Einzelmutante *rtel1-1* konnte nach MMC-Behandlung keine erhöhte Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Die Einzelmutante *fanm-1* reagierte, wie zuvor postuliert, ebenfalls nicht sensitiver als der Wildtyp (Knoll *et al.*, 2012). Interessanterweise konnte für die Doppelmutante *rtel1-1 fanm-1* gezeigt werden, dass ein Verlust beider Helikasen zu einer signifikanten Hypersensitivität führt. Dies deutet darauf hin, dass es mehrere parallele Wege zur Reparatur von *interstrand-crosslinks* gibt. Der Ausfall eines einzelnen Wegs kann durch alternative Reparaturwege kompensiert werden. Ein abweichender Phänotyp wäre in einer Einzelmutante nach Genotoxin-Behandlung demnach nicht feststellbar. Erst der gleichzeitige Verlust eines weiteren Wegs führt zu einem vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Die beiden Helikasen *At*RTEL1 und *At*FANCM lassen sich also in zwei verschiedene Wege zur Reparatur von *interstrand-crosslinks* einordnen. Da das relative Frischgewicht der Doppelmutante nach Behandlung mit unterschiedlichen MMC-Konzentrationen immer noch zwischen 64 % und 30 % liegt (Abbildung 3.9), ist davon auszugehen, dass weitere parallele Reparaturwege existieren.

Interessanterweise konnte zuvor bereits gezeigt werden, dass sowohl die RecQ-Helikase RECQ4A als auch die Endonuklease MUS81 eine wichtige Rolle in der *crosslink*-Reparatur spielen und in zwei parallelen Wegen agieren (Mannuss *et al.*, 2010). Zudem konnte erst kürzlich *AtFANCM* in einen *AtRECQ4A*-unabhängigen Reparaturweg eingeordnet werden (Dangel *et al.*, 2014). Um *AtRTEL1* in diese möglichen Reparaturwege einzuordnen, wurde zusätzlich die Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* gekreuzt und bezüglich ihrer Sensitivität mit den entsprechenden Einzelmutanten und dem Wildtyp verglichen. Die Hypersensitivität von *mus81-1* gegenüber MMC (Hartung *et al.*, 2006) konnte in dieser Arbeit reproduziert werden. Im Gegensatz zur Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* reagierte die Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* nicht sensitiver als die Einzelmutanten. Die Sensitivität war vergleichbar mit der Hypersensitivität der *mus81-1* Einzelmutante (Abbildung 3.12). Diese Ergebnisse legen nahe, dass bei der Reparatur von *interstrand crosslinks* in *A. thaliana* RTEL1 in einem gemeinsamen Weg mit MUS81 wirkt, der parallel zum FANCM-abhängigen beziehungsweise RECQ4A-abhängigen Weg verläuft (Abbildung 4.1).

4.1.4.2 *AtRTEL1* in der *intrastrand-crosslink* Reparatur

Um zu untersuchen, welche Funktionen *AtRTEL1* bei der Reparatur von *intrastrand-crosslinks* übernimmt, wurde *rtel1-1* sowie auch die zuvor getesteten Doppelmutanten und entsprechenden Einzelmutanten mit *cis*-Platin behandelt. Im Gegensatz zur Behandlung mit MMC war der hypersensitive Phänotyp schon in der Einzelmutante *rtel1-1* sichtbar (Abbildung 3.10). RTEL1 spielt demnach sowohl in der Reparatur von *interstrand-crosslinks* als auch in der Reparatur von *intrastrand-crosslinks* in *A. thaliana* eine Rolle. Diese Ergebnisse legen nahe, dass zur Behebung von

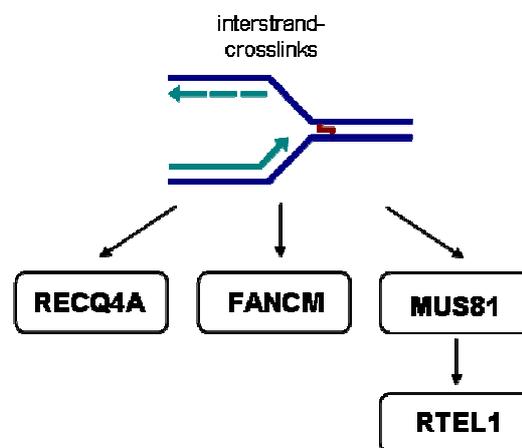


Abbildung 4.1: Modell zur Beteiligung von RTEL1 in der *interstrand-crosslink*-Reparatur in *A. thaliana*. Bei der Reparatur von *interstrand-crosslinks* wirkt RTEL1 in einem gemeinsamen Weg mit MUS81, unabhängig von RECQ4A und FANCM.

intrastrand-crosslink weniger alternative Reparaturwege existieren als zur Behebung von *interstrand-crosslink* und dass RTEL1 einen wichtigen Faktor bei der Reparatur von *intrastrand-crosslink* in *A. thaliana* darstellt.

Die Komplementationlinien wurden ebenfalls mit *cis*-Platin behandelt und zeigten ein mit dem Wildtyp vergleichbares Frischgewicht (Abbildung 3.10). Das bedeutet, dass durch die Komplementation mit dem *RTEL1*-Wildtypkonstrukt der hypersensitive Phänotyp von *rtell-1* wieder aufgehoben werden konnten und die Pflanzen wieder in der Lage waren *intrastrand-crosslink* wie der Wildtyp zu reparieren.

rtell-1 fancm-1

Die Einzelmutante *fancm-1* reagierte, wie erwartet, nicht sensitiver als der Wildtyp auf *cis*-Platin-Behandlung (Knoll *et al.*, 2012; Abbildung 3.11). Genau wie nach MMC-Behandlung konnte nach *cis*-Platin-Behandlung für die Doppelmutante *rtell-1 fancm-1* eine signifikante Hypersensitivität im Vergleich zu *rtell-1* nachgewiesen werden. *ARTEL1* und *AFANCM* wirken demnach auch bei der Reparatur von *intrastrand-crosslinks* in zwei unabhängigen Reparaturmechanismen. Der Verlust von *AFANCM* kann durch andere Reparaturwege kompensiert werden. In einem dieser parallelen Wege ist *ARTEL1* involviert. Da der Verlust von *RTEL1* zu einem hypersensitiven Phänotyp führt, ist dieser Weg vermutlich ein wichtigerer Weg zur Reparatur von *intrastrand-crosslinks* als der *FANCM*-abhängige Weg. Dennoch kann der Ausfall dieses Wegs zu einem gewissen Teil durch *AFANCM* kompensiert werden. Beim gleichzeitigen Verlust von *ARTEL1* und *AFANCM* fallen jedoch gleich zwei Reparaturwege weg, was in Hypersensitivität resultiert. Das relative Frischgewicht der Doppelmutante zwischen 64 % und 35 % nach *cis*-Platin-Behandlung deutet jedoch darauf hin, dass noch weitere parallele Wege zur Reparatur von *intrastrand-crosslinks* existieren.

rtell-1 mus81-1

Die Doppelmutante *rtell-1 mus81-1* wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls nach *cis*-Platin-Behandlung untersucht und mit den entsprechenden Einzelmutanten beziehungsweise dem Wildtyp verglichen. Neben der Hypersensitivität von *rtell-1* gegenüber *intrastrand-crosslinks* konnte die postulierte Hypersensitivität von *mus81-1* gegenüber *cis*-Platin (Hartung *et al.*, 2006) in dieser Arbeit reproduziert werden. Die Doppelmutante *rtell-1 mus81-1* reagierte sensitiver als beide Einzelmutanten. Dieser additive Effekt lässt darauf schließen, dass *ARTEL1* und *AMUS81* bei der Reparatur von *intrastrand-crosslinks* in unterschiedlichen Reparaturwegen agieren. Dieses Ergebnis war insofern interessant, dass die Untersuchung nach MMC-Behandlung einen gemeinsamen Weg der Proteine nahelegte. Während *AMUS81* und *ARTEL1* bei der Reparatur von *interstrand-crosslinks* gemeinsam arbeiten, bilden sie zur Reparatur von *intrastrand-crosslinks* also

zwei unabhängige Wege. *Inter-* und *intrastrand-crosslinks* können in der Zelle durch verschiedene Mechanismen repariert werden. Während *intrastrand-crosslink* über NER oder PRR repariert werden können, ist dies bei *interstrand-crosslinks* nicht möglich, da bei dieser Art von Schaden beide Stränge gleichermaßen betroffen sind. Die Reparatur erfolgt hierbei über eine Kombination aus TLS, NER und HR. Für die Reparatur beider Arten von Schäden gibt es demnach unterschiedliche Reparaturmechanismen, die auch ein unterschiedliches Zusammenspiel der Proteine denkbar macht. Da *ARTEL1* für die Reparatur von *inter-* sowie *intrastrand-crosslinks* wichtig ist, ist diese Helikase möglicherweise sowohl in die HR als auch in die NER involviert. Bei der Reparatur von *interstrand-crosslinks* muss der Schaden vermutlich zunächst durch die Endonuklease MUS81 geschnitten werden, um so ein mögliches Substrat für RTEL1 oder eine andere Helikase zu prozessieren. Dies würde auch den Phänotyp der Doppelmutante *rtell-1 mus81-1* nach MMC-Behandlung erklären: Durch einen Verlust von *AMUS81*, tritt direkt ein alternativer Weg in Kraft, wodurch der Verlust von *ARTEL1* nicht mehr messbar ist.

4.1.5 Rolle von *ARTEL1* im Wurzelmeristem

Die zuvor gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass RTEL1 eine Rolle bei der Reparatur Replikations-assoziiertes DNA-Schäden spielt. Das Wurzelmeristem besteht aus undifferenzierten, sich teilenden Zellen und eignet sich daher sehr gut, um die Auswirkungen von DNA-Schäden auf sich teilende und differenzierende Zellen zu untersuchen. Durch die Untersuchung des Wurzelmeristems in *A. thaliana* sollte die Funktion von RTEL1 bei der Replikation und der Zellteilung während der Wurzelentwicklung analysiert werden. Die Stammzellen in der Wurzelspitze von *A. thaliana* sind in einer Stammzellnische aufgebaut, gefolgt von den TA-Zellen. Die Wachstumsrate hängt von der Anzahl der TA-Zellen ab (Beemster und Baskin, 1998). Diese entstehen wiederum durch die Teilung der Stammzellen. Trifft eine Replikationsgabel auf einen DNA-Schaden, versucht die Zelle diesen zu beheben. Dabei kann es zu Verzögerungen im Zellzyklus kommen. Bleibt der Schaden bestehen, kann es passieren, dass sich die Zellen dennoch teilen. Es entstehen genomisch instabile Zellen, was letztendlich im Zelltod resultiert. Weiterhin könnte es durch den Zellzyklusarrest zum Verlust der Synchronizität während der Zellteilung kommen. Dadurch würde die Zellteilung nicht mehr in geordneten Reihen erfolgen, sondern unkontrolliert, was eine Änderung im Aufbau des Wurzelmeristems mit sich führen würde. Die Methode zur Untersuchung des Wurzelmeristems im Bezug auf Replikations-assoziierte DNA-Schäden wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich am Botanischen Institut II etabliert. Die Wurzeln unbehandelter Keimlinge sowie nach Induktion mit *cis*-Platin wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Da Propidiumiodid, nicht von lebenden Zellen

aufgenommen wird, konnte zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Mittels Konfokalmikroskopie konnte das Ausmaß an Zelltod im Wurzelmeristem ausgewertet werden.

Die vermehrte Anzahl an Wurzeln mit toten Stammzellen in der Mutantenlinie *rtel1-1* bestätigen eine Rolle von RTEL1 in der Reparatur beschädigter Replikationsgabeln in *A. thaliana* (Abbildung 3.18; Abbildung 3.20). Durch den Verlust von AtRTEL1 können einige DNA-Schäden während der Replikation nicht mehr behoben werden. Sind die Schäden zu groß, resultiert dies in einem vermehrt auftretenden Zelltod. Durch die Behandlung der Pflanzen mit *cis*-Platin wurden zusätzliche *intrastrand-crosslinks* induziert. Wie erwartet, erhöhte sich die Anzahl toter Zellen im Wurzelmeristem sowohl im Wildtyp als auch in der *rtel1-1* Mutante. Nach *cis*-Platin-Behandlung war die Anzahl der Wurzeln mit mindestens einer toten Stammzelle in der *rtel1-1* Einzelmutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich höher. Zudem wurden vermehrt Wurzeln mit einem abweichenden Aufbau der SZN beobachtet: In gesunden Wurzeln lassen sich die Stammzellarten anhand der Lage relativ zum Ruhezentrum identifizieren, welches fünf bis sechs Zellreihen über der Wurzelspitze liegt. In der Einzelmutante *rtel1-1* war in vielen der untersuchten Wurzeln diese Identifizierung nicht mehr möglich. Die SZN war umgeordnet und zusätzliche Zellen erkennbar (Abbildung 3.19; Abbildung 3.20). Eine mögliche Erklärung für diese Umordnung ist der Versuch, die toten Zellen der Stammzellnische zu ersetzen. Ein weiterer Grund könnten die Zellzyklusverzögerungen einzelner Zellen sein. Es könnte sein, dass die Synchronizität der Zellteilung nicht mehr gewährleistet wird und die Zellen sich dadurch nicht mehr in geordneten Zellreihen teilen. Eine Rolle von AtRTEL1 während der Reparatur von *intrastrand-crosslinks* konnte im Rahmen dieser Arbeit also mit zwei unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden. Dieser Phänotyp konnte ebenfalls komplementiert werden. Nachdem das RTEL1-Wildtypkonstrukt in die Mutantenlinie *rtel1-1* eingebracht wurde, entwickelten sich die Wurzeln in den homozygoten Komplementationslinien wieder wie der Wildtyp und wiesen eine ähnliche Anzahl an Wurzeln mit toten Stammzellen auf.

Die Wachstumsrate der Wurzeln in *A. thaliana* hängt von der Anzahl sich teilender Zellen ab (Beemster und Baskin, 1998). Die Defekte in der Stammzellnische von *rtel1-1* legten nahe, dass diese Mutantenlinie eine geringere Wurzellänge als der Wildtyp erreicht. Die Bestimmung der Wurzellänge nach sieben Tagen Anzucht zeigten, dass die Wurzellänge tatsächlich mit dem Ausmaß an toten Stammzellen sowie einer fehlerhaften Zellteilung korrelierte. Während die Wurzeln von *rtel1-1* kürzer waren als die vom Wildtyp, zeigten die Komplementationslinien eine vergleichbare Wurzellänge mit dem Wildtyp (Abbildung 3.17). Durch die Komplementation mit dem RTEL1-Wildtypkonstrukt erreichten die Pflanzen der Komplementationslinien bezüglich Länge und toten Stammzellen wieder Wildtypniveau.

rtel1-1 fancm-1

Im Vergleich zum Wildtyp war bei der *fancm-1* Einzelmutante weder die Wurzellänge beeinträchtigt, noch zeigten die Wurzeln eine erhöhte Anzahl an toten Stammzellen (Abbildung 3.17; Abbildung 3.21). Im Gegensatz zur Bestimmung des Frischgewichts mittels Sensitivitätstests zeigte die Untersuchung des Wurzelmeristems in *fancm-1* nach *intrastrand-crosslink*-Induktion einen Anstieg der Anzahl von Wurzeln mit toten Stammzellen, jedoch nicht in dem Ausmaß wie in der Mutantenlinie *rtel1-1* (Abbildung 3.22). FANCM hat daher möglicherweise doch eine Funktion bei der Reparatur von *intrastrand-crosslink* während der Replikation in *A. thaliana*, spielt jedoch eine untergeordnete Rolle. Zudem ergab bei den Sensitivitätstests die Ermittlung des Frischgewichts nach *cis*-Platin-Behandlung bereits einen additiven Effekt in der Doppelmutante *rtel1-1 fancm-1* (Abbildung 3.11). Dieser Phänotyp deutet ebenfalls auf eine mögliche Rolle von *AtFANCM* bei der Reparatur von *intrastrand-crosslinks* hin. Der additive Effekt, der für *rtel1-1 fancm-1* bei Ermittlung des Frischgewichts nach *cis*-Platin-Behandlung festgestellt wurde, konnte ebenfalls im Wurzelmeristem der Doppelmutante beobachtet werden: Sowohl im Grundzustand als auch nach *intrastrand-crosslink*-Induktion durch *cis*-Platin erhöhte sich die Anzahl an untersuchten Wurzeln mit mindestens einer toten Stammzelle im Vergleich zu den jeweilig gleich behandelten Einzelmutanten (Abbildung 3.21). Nach *cis*-Platin-Induktion wurden sogar in jeder Wurzel mindestens eine tote Stammzelle sowie eine tote TA-Zelle beobachtet (Abbildung 3.22). Hätte *AtFANCM* keine Funktion, so wäre die Doppelmutante nicht sensitiver als die *rtel1-1* Einzelmutante, sondern würde ähnlich wie *rtel1-1* reagieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für *rtel1-1 fancm-1* jedoch sowohl eine Hypersensitivität bezüglich des Frischgewichts nachgewiesen werden als auch ein Defekt in der Wurzelentwicklung festgestellt werden. Bei der Reparatur von *intrastrand-crosslinks* wirken *AtFANCM* und *AtRTEL1* demnach in zwei unabhängigen Mechanismen zur Reparatur dieser Schäden. Im Fall der natürlich auftretenden *intrastrand-crosslinks* im Grundzustand übernimmt *AtRTEL1* eine Hauptfunktion. Beim Verlust von *AtRTEL1* kann ein Teil der spontan auftretenden *intrastrand-crosslinks* nicht mehr repariert werden. Die Replikation wird nicht fortgeführt und es kommt letztendlich zum Zellzyklusarrest und zum Zelltod genomisch instabiler Zellen, was die kurzen Wurzeln und den erhöhten Zelltod im Wurzelmeristem von *rtel1-1* erklärt. Bei Induktion zusätzlicher *intrastrand-crosslinks* in *A. thaliana*, erhöht sich die Anzahl toter Zellen im Wurzelmeristem von *rtel1-1*. Ein Teil der *intrastrand-crosslinks* wird wahrscheinlich außerdem über den FANCM-abhängigen Reparaturweg behoben, was das leicht erhöhte Ausmaß toter Stammzellen beim Ausfall von *AtFANCM* nach *cis*-Platin-Induktion erklärt. Beim Ausfall beider Reparaturwege hat dies während der Replikation schwerwiegende Folgen, was letztendlich in einem erhöhten Zelltod resultiert. Die lebenden Stammzellen versuchen durch unkontrollierte Zellteilung den erhöhten Zelltod auszugleichen,

was in einer Umorganisation der SZN resultiert. Ein Verlust der Zellpolarität könnte auch ein möglicher Grund für die Umstrukturierung der SZN sein. Die Umstrukturierung der SZN wird in der Doppelmutante durch zusätzliche Genotoxin-induzierte *intrastrand-crosslinks* verstärkt.

Da durch die Untersuchung der Zellteilung im Wurzelmeristem bereits ohne Zugabe von Genotoxinen eine Aussage über eine mögliche Rolle von Proteinen während der Reparatur arretierter Replikationsgabeln gemacht werden kann, ist diese Methode möglicherweise eine sensiblere Methode als die Bestimmung des Frischgewichts nach Genotoxin-Behandlung.

rtel1-1 mus81-1

Die wichtige Rolle von AtMUS81 bei der Reparatur von *intrastrand-crosslinks* wurde ebenfalls bei der Untersuchung der Wurzeln festgestellt. Die Färbung mit Propidiumiodid ergab eine deutlich erhöhte Rate an Wurzeln mit einer toten Stammzelle (Abbildung 3.21). Durch die Induktion zusätzlicher *intrastrand-crosslinks* durch *cis*-Platin stieg ebenfalls die Anzahl toter Stammzellen in der Einzelmutante und es wurden vermehrt Wurzeln mit einer veränderten SZN festgestellt (Abbildung 3.22).

Die Bestimmung der Wurzellänge der Mutantenlinie *mus81-1* zeigten, dass die Wurzellänge mit dem Ausmaß an toten Stammzellen sowie einer fehlerhaften Zellteilung korrelierte. Die Wurzeln von *mus81-1* waren kürzer als die des Wildtyps und hatten eine vergleichbare Länge mit den Wurzeln von *rtel1-1* (Abbildung 3.17).

Ähnlich wie bei der Bestimmung des relativen Frischgewichts nach *cis*-Platin-Induktion, ergaben auch die Untersuchungen des Wurzelmeristems in der Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* einen additiven Effekt. Die Wurzeln der Doppelmutante waren kürzer als die beider Einzelmutanten, was mit einer erhöhten Anzahl toter Stammzellen und einer erhöhten Anzahl der Wurzeln mit ungeordneter Stammzellnischen korrelierte (Abbildung 3.21). Durch die zusätzliche Induktion von *intrastrand-crosslinks* wurde dieser Phänotyp der Doppelmutante weiter verstärkt (Abbildung 3.22). Dies deutet auf eine Funktion von AtMUS81 bei der Reparatur Replikations-assoziiertes Schäden hin, die parallel zur Funktion von AtRTEL1 existiert. Durch den Verlust von AtMUS81 kann eine Vielzahl der *intrastrand-crosslinks* nicht mehr behoben werden, was letztendlich zu einer erhöhten Anzahl toter Stammzellen führt. Dieser Phänotyp wird durch den zusätzlichen Verlust des Reparaturwegs, in dem AtRTEL1 agiert, noch weiter verstärkt, sodass nahezu jede Wurzel mindestens eine tote Stammzelle sowie eine tote TA-Zelle aufweist.

AtRTEL1, AtMUS81 sowie AtFANCM spielen demnach alle eine Rolle in der Reparatur Replikations-assoziiertes Schäden. Ein Verlust der Proteine führt zur Verzögerung im Zellzyklus und zu einem vermehrten Zelltod. Es konnte gezeigt werden, dass AtRTEL1 und AtFANCM bei der Reparatur von *intrastrand-crosslinks* in zwei parallelen Wegen agieren und dass AtRTEL1 und

*At*MUS81 ebenfalls in unterschiedlichen Wegen funktionieren. Der gleichzeitige Verlust von FANCM und MUS81 führt in *A. thaliana* zu schweren Entwicklungsdefekten und endet letztendlich letal (Crismani *et al.*, 2012; Dangel *et al.*, 2014), was nahelegt, dass diese beiden Proteine ebenfalls in zwei parallelen Wegen agieren. Demnach lassen sich RTEL1, FANCM und MUS81 in drei unabhängige Wege zur Reparatur von *intrastrand-crosslinks* in *A. thaliana* einordnen.

rtell-1 recq4A-4

Wie schon erwähnt, spielt die RecQ-Helikase RECQ4A ebenfalls eine Rolle in der *intrastrand-crosslink* Reparatur in *A. thaliana* und agiert in einem parallelen Weg zu MUS81 und FANCM (Hartung *et al.*, 2007; Mannuss *et al.*, 2010; Knoll *et al.*, 2012; Dangel *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Doppelmutanten wies die Mutantenlinie *rtell-1 recq4A-4* schwere Entwicklungsdefekte auf. Neben einer geänderten Blattmorphologie kam es bei den Pflanzen zu Verwachsungen der Haupt- und Nebentriebe. Die Pflanzen waren im Vergleich zu Wildtyppflanzen sehr klein und hatten sehr kurze Wurzeln. Zudem war die Doppelmutante steril und ließ sich folglich nicht homozygot vermehren. Aufgrund der starken Wuchsdefekte in der Doppelmutante waren die Rekombinations- und Sensitivitätstests, wie sie zur Analyse der anderen Mutantenlinien dienen, nicht möglich. Es musste davon ausgegangen werden, dass durch weniger Zellen in der Mutante die durchschnittliche Anzahl der Rekombinationsereignisse pro Pflanze nicht mehr mit der Anzahl im Wildtyp vergleichbar war. Bei Bestimmung des Frischgewichts war aufgrund der deutlich kleineren Keimlinge damit zu rechnen, dass eine Reduktion des Frischgewichts nach Genotoxin-Behandlung nicht mehr detektierbar war. Eine Möglichkeit, die Doppelmutante dennoch zu untersuchen und mit den Einzelmutanten und dem Wildtyp zu vergleichen, bestand in der Untersuchung des Wurzelmeristems. Die starken Wuchsdefekte und die extrem kurzen Wurzeln deuteten bereits auf schwere Defekte während der Zellteilung hin und konnten durch die Untersuchung des Wurzelmeristems bestätigt werden. Die Wurzellänge des Wildtyps und der *recq4A-4* Einzelmutante war vergleichbar, was mit einer ähnlich geringen Anzahl toter Stammzellen korrelierte. Die Rolle von *At*RECQ4A bei der Reparatur blockierter Replikationsgabeln ist demnach untergeordnet und kann durch andere Reparaturwege ausgeglichen werden. Nach zusätzlicher Induktion von *intrastrand-crosslinks* kam es allerdings auch in dieser Mutantenlinie zu einer erhöhten Anzahl an Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem. Durch die Untersuchung des Wurzelmeristems konnte also ebenfalls eine Rolle von RECQ4A für die Reparatur von *intrastrand-crosslinks* in *A. thaliana* nachgewiesen werden. Die Wurzeln der Doppelmutante *rtell-1 recq4A-4* zeigten bereits im Grundzustand eine komplett veränderte Wurzelmorphologie. Das Wurzelmeristem war völlig umstrukturiert und ließ eine Identifizierung der einzelnen Stammzellarten nicht mehr zu. Die Zellanordnung war in allen

untersuchten Wurzeln diffus und es waren keine geordneten Zellreihen erkennbar. Im Gegensatz zu den Doppelmutanten *rtel1-1 fancm-1* beziehungsweise *rtel1-1 mus81-1* waren weniger tote Stammzellen erkennbar. Diese Beobachtungen liegen vermutlich daran, dass ein gleichzeitiger Verlust der beiden Helikasen RTEL1 und RECQ4A in *A. thaliana* zu einem sehr frühen Stammzelltod in der Entwicklung führt. Es waren daher kaum noch teilungsfähige Zellen übrig und somit konnten auch durch Propidiumiodid nur wenige tote Zellen identifiziert werden. Das Resultat in der Doppelmutante waren völlig degenerierte Wurzeln, welche die detaillierte Untersuchung der SZN nicht mehr möglich machten.

Der starke Effekt einer gleichzeitigen Mutation von RTEL1 und der RecQ-Helikase RECQ4A konnte bereits in *C. elegans* festgestellt werden. In *C. elegans* resultiert der gleichzeitige Ausfall des RTEL1-Homologs und der homologen RecQ-Helikase HIM6 in Letalität (Barber *et al.*, 2008). Dieser letale Phänotyp lässt sich außerdem in Hefe bei der gleichzeitigen Mutation des RTEL1-Analogons SRS2 und dem RECQ4A-Homolog SGS1 feststellen (Lee *et al.*, 1999). Der Grund für diesen Phänotyp ist die Ansammlung toxischer Rekombinationsintermediate. Diese entstehen vermutlich dadurch, dass weder eine Auflösung von D-Loops über den SDSA-Weg mittels *Sc*SRS2 beziehungsweise *Ce*RTEL1 noch die Reparatur von Rekombinationsintermediaten mittels *Sc*SGS1 beziehungsweise *Ce*HIM6 möglich ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Vermutung zu, dass es in *A. thaliana* bei einem Verlust von RTEL1 und der RecQ-Helikase RECQ4A ebenfalls zur Ansammlung toxischer Rekombinationsintermediate kommt. Anders als in Hefe und *C. elegans* endet dies für die Pflanze jedoch nicht letal. Der Grund könnte das Vorhandensein mehrerer weiterer paralleler Reparaturwege sein, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Zudem sind in *A. thaliana* sowohl SRS2 als auch RTEL1 konserviert. Möglicherweise können beim Verlust von *At*RTEL1 und *At*RECQ4A ein Teil der Rekombinationsintermediate durch *At*SRS2 aufgelöst werden, wodurch eine vollständige Letalität vermieden werden könnte.

Zusammenfassend lassen sich die in dieser Arbeit erworbenen Daten zu RTEL1 und den Doppelmutanten wie folgt in die Reparatur von *intrastrand-crosslinks* in *A. thaliana* einordnen: Kommt es zu einem Replikationsblock aufgrund von *intrastrand-crosslinks*, stellt RTEL1 eine Möglichkeit zur Reparatur dieser Schäden in einem von FANCM-, MUS81- und RECQ4A-unabhängigen Weg dar. Für die Reparatur von *intrastrand-crosslinks* in *A. thaliana* ist bereits bekannt, dass MUS81 und RECQ4A in zwei parallelen Reparaturmechanismen wirken (Mannuss *et al.*, 2010). Da der gleichzeitige Verlust von FANCM und MUS81 in *A. thaliana* zu starken Wuchsdefekten führt und die Pflanzen letztendlich absterben (Crismani *et al.*, 2012; Dangel *et al.*, 2014), wirken auch diese beiden Proteine vermutlich in unabhängigen Wegen. Für die Doppelmutante *recq4A-4 fancm-1* konnte kein additiver Effekt bezüglich der Hypersensitivität

gegenüber *intrastrand-crosslinks* festgestellt werden (Dangel *et al.*, 2014), was nahelegt, dass die beiden Proteine einen gemeinsamen Reparaturweg bilden. Ein mögliches Schema ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Zudem gibt es noch einen weiteren Weg zur Reparatur von CLs in *A. thaliana*, bei dem RAD5A den Hauptfaktor bildet (Mannuss *et al.*, 2010). Um eine Aussage zu möglichen unabhängigen Wegen von RTEL1 und RAD5A machen zu können, müssen in weiteren Experimenten die Doppelmutante *rtel1-1 rad5A* untersucht werden.

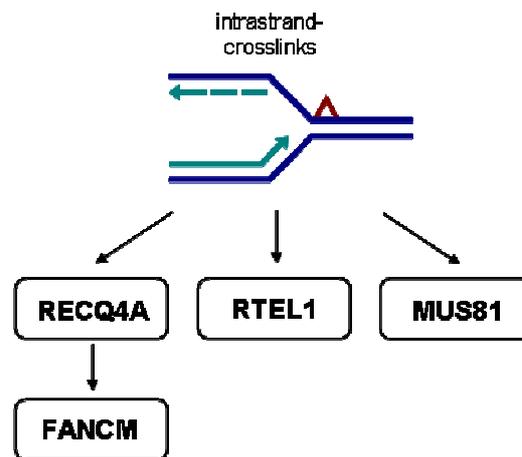


Abbildung 4.2: Modell zur Beteiligung von RTEL1 in der *intrastrand-crosslink*-Reparatur in *A. thaliana*. Bei der Reparatur von *intrastrand-crosslinks* agiert RTEL1 in einem parallelen Reparaturweg zu MUS81 beziehungsweise RECQ4A und FANCM.

4.1.6 Einfluss von *AtRTEL1* und *AtMUS81* auf die Fertilität

Neben einer Rolle in der Reparatur Replikations-assoziiierter DNA-Schäden konnte für *AtRTEL1* eine Rolle in der Fertilität festgestellt werden. Die Mutantenlinie *rtel1-1* produzierte weniger Samen pro Schote als der Wildtyp (Abbildung 3.13). Auch dieser Phänotyp konnte durch die Komplementation mit dem *RTEL1*-Wildtypkonstrukt wieder aufgehoben werden. Die Komplementationslinien produzierten wieder eine vergleichbare Anzahl an Samen pro Schote mit dem Wildtyp. Bei der Etablierung der Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* wurde festgestellt, dass diese Linie deutlich weniger Samen produzierte. Für die Endonuklease MUS81 wurde bereits eine Funktion während der Meiose in *A. thaliana* festgestellt (Hartung *et al.*, 2006; Berchowitz *et al.*, 2007). Der Verlust von MUS81 resultiert in *A. thaliana* während der Meiose in einer verringerten Anzahl an COs und in einer eingeschränkten Pollenvitalität (Berchowitz *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anzahl der Samen pro Schote in der Doppelmutante *rtel1-1* bestimmt und mit den beiden Einzelmutanten sowie dem Wildtyp verglichen. Für *mus81-1* konnte ebenfalls eine eingeschränkte Fertilität festgestellt werden. Die Pflanzen produzierten ähnlich viele Samen pro Schote wie die Pflanzen der Mutantenlinie *rtel1-1*. Die Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* hatte

im Vergleich zu beiden Einzelmutanten eine stark eingeschränkte Fertilität und die durchschnittliche Anzahl der Samen pro Schoten reduzierte sich von circa 30 Samen pro Schote in den Einzelmutanten auf fünf Samen pro Schote (Abbildung 3.13).

Diese geringere Fertilität kann mehrere Gründe haben. So kann dieser Defekt durch eine fehlerhafte Meiose entstehen oder auf eine anschließende fehlerhafte Gametophytenentwicklung hindeuten. Der additive Effekt in der Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* könnte durch eine Funktion von *AtRTEL1* während der Meiose ausgelöst werden. Zudem wäre eine Addition zwei aufeinanderfolgender Ereignisse denkbar: Während der Verlust von *AtMUS81* in weniger COs in der Meiose resultiert, kommt es durch den Verlust von *AtRTEL1* zu einer defekten Gametophytenentwicklung. Beide Effekte zusammen würden die verringerte Anzahl an Samen pro Schote ebenfalls erklären.

In *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass *RTEL1* wichtig für eine korrekte Meiose ist (Youds *et al.*, 2010). Daher wurde die Rolle von *RTEL1* in der Meiose von *A. thaliana* ebenfalls untersucht. Zur Untersuchung der Meiose wurden Mikrosporenmutterzellen präpariert und die DNA mit DAPI markiert. Dabei konnten in der Mutantenlinie *rtel1-1* kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp beobachtet werden. Die Untersuchung der Meiose ist komplex und durch die Analyse der DAPI-markierten Meiosestadien kann ein Defekt in der Meiose nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Beispielsweise weisen die präparierten und mit DAPI markierten Mikrosporenmutterzellen von *mus81-1* keine vom Wildtyp abweichenden Meiosestadien auf. Dennoch konnte gezeigt werden, dass der Grund für die eingeschränkte Fertilität in *mus81-1* eine reduzierte Anzahl an COs während der Meiose ist (Berchowitz *et al.*, 2007). Die stark eingeschränkte Fertilität in der Doppelmutante *rtel1-1 mus81-1* ließ vermuten, dass die Analyse der Meiosestadien Aufschluss über die Funktion von *AtRTEL1* gibt. Es wurde jedoch kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp festgestellt. Durch die Untersuchung der Pollenvitalität in den Mutantenlinien sollte untersucht werden, ob sich der additive Effekt in der Doppelmutante möglicherweise auf einen Defekt in der Meiose durch den Verlust von *MUS81* und einen gleichzeitigen Defekt in der Pollenentwicklung durch einen Verlust von *RTEL1* zurückführen lässt.

Die Pollenvitalität der beiden Einzelmutanten und der Doppelmutante war vergleichbar. Insgesamt erschienen die Antheren der Mutantenlinien kleiner und leerer. Es war nicht möglich, die genaue Pollenanzahl pro Antheren zu bestimmen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Antheren der Mutantenlinien kleiner waren als die Antheren vom Wildtyp im gleichen Entwicklungsstadium. Ein additiver Effekt bezüglich der Antherengröße konnte in der Doppelmutante nicht festgestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht genau identifiziert werden, an welcher Stelle der Gametogenese *RTEL1* eine Rolle in *A. thaliana* spielt.

Durch Rückkreuzungsversuche konnte jedoch nachgewiesen werden, dass sowohl die männliche als auch die weibliche Gametogenese in der Doppelmutante beeinträchtigt sind und der Effekt nicht geschlechtsspezifisch ist. Weiterhin deuten die kleineren Antheren daraufhin, dass die Entwicklungsprobleme schon vor oder während der Meiose auftreten. Wäre nur die Pollenentwicklung betroffen, so sollte es in *rtel1-1* zu einer mit dem Wildtyp vergleichbaren Anzahl an Pollen kommen, bei der die Rate nicht lebensfähiger Pollen erhöht wäre. Die wenigen Pollen pro Anthere deuten jedoch darauf hin, dass insgesamt weniger Mikrosporencellen gebildet werden, wodurch folglich auch nur weniger Pollen gebildet werden können. Der Verlust von RTEL1 könnte in *A. thaliana* also schon prämeiotische Auswirkungen auf die Entwicklung haben. Möglicherweise gehen aufgrund eines Verlusts von RTEL1 weniger Meiozyten in die Meiose über. Die genaue Funktion konnte jedoch bisher nicht geklärt werden und benötigt noch weitere Untersuchungen. Dass RTEL1 wichtig für die Fertilität in *A. thaliana* ist, konnte jedoch eindeutig gezeigt werden.

4.1.7 Die Funktion von *At*RTEL1 in der Telomerstabilität

Aufgrund der linearen Anordnung eukaryotischer Chromosomen wird die Zelle vor zwei Probleme gestellt: Zum einen kann nicht zwischen Chromosomenenden und schädigenden DSBs unterschieden werden (*end protection problem*) und zum anderen ist die Zelle nicht in der Lage, die Chromosomenenden vollständig zu replizieren (*end replication problem*). Die Telomere an den Enden der Chromosomen schützen die Chromosomen vor diesen Problemen, indem sie mit Telomer-Binde-Proteinen interagieren. So ermöglichen sie die Unterscheidung zwischen Chromosomenende und DNA-Schaden und haben dadurch Einfluss auf die Genomstabilität.

In Mäusen und im Menschen konnte bereits eine Funktion von RTEL1 an den Telomeren nachgewiesen werden (Ding *et al.*, 2004; Vannier *et al.*, 2012; Le Guen *et al.*, 2013; Lee, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls in *A. thaliana* eine Funktion von RTEL1 beim Telomererhalt gezeigt werden.

Um eine mögliche Funktion von RTEL1 beim Erhalt der Telomerintegrität in *A. thaliana* zu untersuchen, wurde die Doppelmutante *rtel1-1 tert* durch Kreuzung hergestellt. Das Protein Telomerase wirkt dem *end replication problem* entgegen, indem es die verkürzten Telomere mittels reverser Transkription verlängert. In *A. thaliana* verursacht der Verlust der Telomerase in *tert* eine rapide kontinuierlich Verkürzung der Telomere. Mit jeder Replikation werden die Chromosomenenden kürzer, was die Genomstabilität letztendlich negativ beeinflusst. Die ersten Auswirkungen auf die Entwicklung lassen sich nach der fünften Generation beobachten. Bis zur zehnten Generation haben die Wuchsdefekte so ein großes Ausmaß erreicht, dass die

Entwicklung letztendlich zum Erliegen kommt und keine Nachkommen mehr gebildet werden können (Riha *et al.*, 2001). In der Doppelmutante *rtel1-1 tert* konnten bereits in der vierten homozygoten Generation (F5) diese schweren Wuchsdefekte beobachtet werden. Im Gegensatz zu beiden Einzelmutanten und dem Wildtyp wies die Doppelmutante eine geänderte Blatt- und Sprossmorphologie auf. Die Pflanzen waren deutlich kleiner und steril und die Pflanzenentwicklung kam bereits in dieser Generation zum Erliegen (Abbildung 3.23). Diese deutlich früher auftretenden Defekte in der Doppelmutante deuten auf eine Rolle von *ARTEL1* in der Telomerhomöostase hin. Diese Vermutung wurde zudem durch die Untersuchung der Wurzeln bestätigt. Die Wurzellänge der Doppelmutante war in der F5-Generation deutlich kürzer als in der vorherigen Generation und kürzer als die Wurzeln der Einzelmutanten der entsprechenden Generation (Abbildung 3.24). Diese Beobachtungen korrelierten mit einer erhöhten Rate an Wurzeln mit toten Stammzellen. Das Ausmaß an Wurzeln mit toten Stammzellen war sowohl in der F4 als auch der F5 in der Doppelmutante höher als in beiden Einzelmutanten der entsprechenden Generation (Abbildung 3.25; Abbildung 3.26). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen wäre, dass sich in der Doppelmutante *rtel1-1 tert* die Telomere noch rapider verkürzen als in der *tert* Einzelmutante. Bereits nach der dritten homozygoten Generation (F4) sind die Chromosomenenden nahezu ungeschützt. Chromosomenfusionen und Chromosomenbrüche sind die Folge, was zum Zelltod dieser genetisch instabilen Zellen führt. In der vierten homozygoten Generation (F5) erreichten die Defekte aufgrund der ungeschützten Telomere noch ein größeres Ausmaß und es wurden noch mehr Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem festgestellt. Der erhöhte Stammzelltod führte weiterhin bei den verbleibenden Zellen zu einem Umbau des Wurzelmeristems, was in einer diffus angeordneten SZN resultierte. Durch die zusätzliche Induktion von replikativem Stress durch *cis*-Platin wurde der Zelltod in allen Linien erhöht. In der F5-Generation der Doppelmutante hatte nahezu jede untersuchte Wurzel eine umstrukturierte SZN (Abbildung 3.25; Abbildung 3.26).

Um eine genauere Aussage über die Auswirkung eines Verlusts von *RTEL1* auf die Telomere in *A. thaliana* machen zu können, wurden mittels Southern Blot die TRFs der Doppelmutante *rtel1-1 tert* untersucht und mit denen der Einzelmutanten beziehungsweise des Wildtyps in der F3- und F4-Generation verglichen. Mittels Hybridisierung mit einer 5'-markierten Telomer-spezifischen Sonde konnte die Telomerlänge bestimmt werden (Abbildung 3.27). Für die *tert* Einzelmutante war eine kontinuierliche Verkürzung der Telomere über die Generationen hinweg bereits bekannt (Riha *et al.*, 2001) und konnte in dieser Arbeit reproduziert werden. In *rtel1-1* wurden sowohl in der F3- als auch der F4-Generation längere Telomere als in der entsprechenden Wildtyp-Generation festgestellt. In der Doppelmutante *rtel1-1 tert* war bereits in der F3-Generation kein

Telomersignal mehr detektierbar, was auf einen rapiden Telomerverlust in der Doppelmutante schließen lässt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass ein Verlust von RTEL1 in *A. thaliana* zu längeren Telomeren führt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der bereits bekannten Funktion von RTEL1 beim Telomererhalt anderer Organismen. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass RTEL1 wichtig zur Auflösung von T-Loops ist und G4-DNA entgegenwirkt. Der Verlust von RTEL1 führt zur rapiden Verkürzung der Telomere und Telomerfragilität (Ding *et al.*, 2004; Vannier *et al.*, 2012). Im Menschen konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass Mutationen in RTEL1 das Hoyeraal-Hreidarsson Syndrom verursachen. Eines der Symptome dieser Krankheit sind verkürzte Telomere (Ballew *et al.*, 2013b; Deng *et al.*, 2013; Le Guen *et al.*, 2013). In *A. thaliana* wurde für die *ku70* Mutante ein ähnlicher Phänotyp beschrieben. Während der Verlust von KU70 im Menschen und in Hefe zu kürzeren Telomeren führt, wurden in *A. thaliana* längere Telomere als im Wildtyp festgestellt (Übersicht in Gallego und White, 2005). Der Grund für die längeren Telomere in der *ku70*-Mutante ist der Verlust einer negativen Regulation der Telomerase. Beim gleichzeitigen Verlust von KU70 und TERT zeigen die Doppelmutanten eine rapide Telomerverkürzung (Riha und Shippen, 2003). Weiterhin konnte für *AKU70* gezeigt werden, dass es den ALT-Mechanismus unterdrückt und der Bildung von T-Circles entgegenwirkt, die durch HR an den T-Loops entstehen (Zellinger *et al.*, 2007). RTEL1 könnte in *A. thaliana* eine ähnliche Funktion an den Telomeren übernehmen. *ARTEL1* könnte ebenfalls die Telomerase negativ regulieren. Dies würde die verlängerten Telomere in *rtel1-1* erklären. Durch den Verlust von RTEL1 kommt es vermutlich in *A. thaliana* zu einer erhöhten Aktivität der Telomerase, wodurch die Telomere, trotz angemessener Länge weiter verlängert werden. Der ALT-Mechanismus ist ein alternativer Weg zur Aufrechterhaltung der Telomerlänge, der auf HR basiert. Eine fehlerhafte Regulierung in der *rtel1-1* Mutante könnten die längeren Telomere ebenfalls erklären. Die Doppelmutante *rtel1-1 tert* weist hingegen eine rapide Telomerverkürzung auf, die bereits in den F3- und F4-Generationen die Detektion von TRFs nicht mehr möglich macht und letztendlich vermutlich in völligem Telomerverlust resultiert. Eine mögliche Erklärung für diesen deutlich schnelleren Telomerverlust in der Doppelmutante *rtel1-1 tert* als in der Einzelmutante *tert* könnte eine Funktion von *ARTEL1* bei der korrekten Auflösung der T-Loops sein. Es könnte sein, dass RTEL1 in *A. thaliana* sowohl die Telomerase reguliert als auch eine HR-unterdrückende Wirkung an den Telomeren hat und für die korrekte Auflösung der T-Loops während der Replikation benötigt wird: Beim Verlust von RTEL1 kommt es also zu einer Verlängerung der Telomere aufgrund der erhöhten Telomeraseaktivität. Zudem werden die T-Loops durch HR aufgelöst, was zur Bildung von T-Circles und dadurch zu einer rapiden Telomerverkürzung führt. Durch den gleichzeitigen Verlust der Telomerase kann dieser

Telomerverkürzung nicht mehr entgegengewirkt werden, was in der Doppelmutante *rtel1-1 tert* zu einem noch schnelleren Telomerverlust führt als in der *tert* Einzelmutante.

In Mäusen konnte eine ähnliche Wirkung für RTEL1 bereits gezeigt werden. Hier ermöglicht RTEL1 eine korrekte Auflösung der T-Loops, um so eine vollständige Replikation der Telomere zu gewährleisten. Ein Verlust von RTEL1 resultiert in einer fehlerhaften Auflösung der T-Loops. T-Circles sind die Folge (Vannier *et al.*, 2012). Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob RTEL1 in *A. thaliana* ebenfalls wichtig für die korrekte Auflösung von T-Loops ist, sind noch weitere Untersuchungen nötig. Eine Möglichkeit zur Detektion von T-Circles besteht mittels T-Circle Amplifikation (TCA). Dabei wird mit Hilfe Telomer-spezifischer Primer sowie der ϕ 29-Polymerase mittels *rolling-circle* Amplifikation lange einzelsträngige Telomer-DNA synthetisiert, welche mittels Southern Blot detektiert werden kann (Zellinger *et al.*, 2007).

Weiterhin konnte in Mäusen gezeigt werden, dass RTEL1 und BLM in parallelen Wegen G4-DNA an den Telomeren entgegenwirken, um die Replikation der Telomere zu ermöglichen und Telomerfragilität zu verhindern (Sfeir *et al.*, 2009; Vannier *et al.*, 2012). Eine ähnliche Funktion wäre auch für RTEL1 in *A. thaliana* denkbar. Diese Funktion wäre außerdem eine weitere mögliche Erklärung für die schweren Entwicklungsdefekte bei dem gleichzeitigen Verlust von *AtRTEL1* und dem BLM-Homolog *AtRECQA4A*.

5 Zusammenfassung

Die homologe Rekombination ist ein wichtiger Prozess in allen Organismen, dessen strenge Regulation für den Erhalt der Genomstabilität essentiell ist.

In *A. thaliana* wurde bereits für die RecQ-Helikase RECQ4A sowie für die Helikase/Translokase FANCM eine HR-supprimierende Wirkung beschrieben. Durch die Charakterisierung eines RTEL1-Homologs konnte in dieser Arbeit eine weitere Antirekombinase in *A. thaliana* identifiziert werden. Mittels Rekombinationstests konnte gezeigt werden, dass die DNA-Helikase RTEL1 der HR entgegenwirkt und dabei in einem parallelen Weg zu FANCM agiert. Der gleichzeitige Verlust von RECQ4A und RTEL1 führt in den Pflanzen zu schweren Entwicklungsdefekten, was annehmen lässt, dass die beiden Helikasen ebenfalls in unabhängigen Wegen agieren. RTEL1, RECQ4A und FANCM bilden vermutlich drei unabhängige Wege zur Auflösung von Rekombinationsintermediaten an Replikationsgabeln in *A. thaliana*.

Die Untersuchung der Rolle von RTEL1 in der DNA-Reparatur legt ebenfalls eine Funktion an Replikationsgabeln nahe. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe zwei verschiedener Methoden gezeigt werden, dass RTEL1 eine Rolle in der Reparatur von *inter-* und *intrastrand crosslinks* an Replikationsgabeln spielt und ein Verlust von RTEL1 in Hypersensitivität gegenüber *intrastrand-crosslinks* resultiert. Die gezielte Untersuchung der Zellteilung im Wurzelmeristem lässt auf eine Verzögerung im Zellzyklus in der Mutantenlinie *rtel1-1* schließen. Zudem wurde ein erhöhtes Ausmaß an Zelltod aufgrund der Eliminierung genetisch instabiler Zellen nachgewiesen. Weiterhin konnte RTEL1 durch Epistasis-Analysen in die Reparatur von *crosslinks* eingeordnet werden, wobei deutlich wurde, dass RTEL1 sowohl für die Reparatur von *inter-* als auch *intrastrand crosslinks* wichtig ist. Während RTEL1 bei der Reparatur von *interstrand-crosslinks* in einem gemeinsamen Weg mit der Endonuklease MUS81 wirkt, verläuft die Reparatur von *intrastrand-crosslinks* parallel zu MUS81.

Neben einer Funktion in der Reparatur Replikations-assoziiierter Schäden konnte für RTEL1 außerdem eine Funktion in der Telomerhomöostase nachgewiesen werden. Hier wirkt RTEL1 vermutlich als negativer Regulator auf die Telomerase, was in der Mutantenlinie *rtel1-1* zu längeren Telomeren führt. Durch den gleichzeitigen Verlust von TERT konnte eine rapide Verkürzung der Telomere nachgewiesen werden, die deutlich schneller verläuft als in der *tert*-Einzelmutante, was bereits nach vier Generationen in der Doppelmutante zum vollständigen Erliegen der Entwicklung führt.

Mit dieser Arbeit konnte somit die DNA-Helikase RTEL1 in *A. thaliana* grundlegend charakterisiert und ihre Funktionen in der DNA-Reparatur, der homologen Rekombination sowie in der Telomerstabilität definiert werden. Die Untersuchungen eröffneten neue interessante Fragestellungen, die in weiteren Arbeiten erörtert werden sollten.

6 Summary

Homologous recombination is a crucial process in all organisms. To prevent genome instability HR has to be tightly regulated. In *A. thaliana*, it has been shown that the RecQ helicase RECQ4A as well as the helicase/translocase FANCM suppress the HR. With the characterisation of a RTEL1 homologue another antirecombinase was identified in *A. thaliana*, during this work. With recombination assays it was shown that the DNA helicase RTEL1 counteracts the HR and acts in a parallel pathway to that of FANCM. The loss of RECQ4A and RTEL1 results in severe developmental defects. This is why the helicases are supposed to act in independent pathways as well. In *A. thaliana* RTEL1, RECQ4A and FANCM likely work in parallel pathways to resolve recombination intermediates at stalled replication forks.

Additionally, RTEL1 seems to play a role during DNA repair. In the presented work, it has been shown with two different methods, that RTEL1 contributes in the repair of inter- and intrastrand crosslinks at stalled replication forks. The loss of RTEL1 results in hypersensitivity to intrastrand crosslinks. The specific examination of the root meristem suggests a delay in the cell cycle of the mutant line *rtel1-1*. In addition to this, an increased amount of cell death in the stem cell niche was observed. Furthermore, epistasis analysis showed a function of RTEL1 in the repair of inter-, as well as intrastrand crosslinks. While RTEL1 and the endonuclease MUS81 share the same pathway during the repair of interstrand crosslinks, they act in parallel pathways to repair intrastrand crosslinks.

Not only does RTEL1 contribute in the repair of replication-associated DNA damage in *A. thaliana*, it has also been shown that RTEL1 also contributes in telomere homeostasis. RTEL1 likely regulates the telomerase negatively which causes longer telomeres in the mutant line *rtel1-1*. The loss of RTEL1 and TERT leads to a rapid telomere shortening which is much faster than in

the single mutant line *tert* and leads to a developmental arrest in the double mutant after four generations.

The collective data of this work could characterize the DNA helicase RTEL1 in *A. thaliana* and defined its functions in DNA repair, homologues recombination and telomere homeostasis. The studies pose new interesting questions that should be addressed in future work.

7 Literaturverzeichnis

- Aguilera, A. und Klein, H. L. (1988). "Genetic control of intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and genetic characterization of hyper-recombination mutations." *Genetics* **119**(4): 779-90.
- Ahmad, A., Robinson, A. R., Duensing, A., van Drunen, E., Beverloo, H. B., Weisberg, D. B., Hasty, P., Hoeijmakers, J. H. und Niedernhofer, L. J. (2008). "ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair." *Mol Cell Biol* **28**(16): 5082-92.
- Alexander, M. P. (1969). "Differential staining of aborted and nonaborted pollen." *Stain Technol* **44**(3): 117-22.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. und Ecker, J. R. (2003). "Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*." *Science* **301**(5633): 653-7.
- Amiard, S., White, C. und Gallego, M. E. (2011). "Recombination proteins and telomere stability in plants." *Curr Protein Pept Sci* **12**(2): 84-92.
- Amiard, S., Da Ines, O., Gallego, M. E. und White, C. I. (2014). "Responses to telomere erosion in plants." *PLoS One* **9**(1): e86220.
- Avery, O. T., Macleod, C. M. und McCarty, M. (1944). "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii." *J Exp Med* **79**(2): 137-58.
- Azam, M., Lee, J. Y., Abraham, V., Chanoux, R., Schoenly, K. A. und Johnson, F. B. (2006). "Evidence that the *S.cerevisiae* Sgs1 protein facilitates recombinational repair of telomeres during senescence." *Nucleic Acids Res* **34**(2): 506-16.
- Bae, S. H., Choi, E., Lee, K. H., Park, J. S., Lee, S. H. und 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**(41): 26880-90.

- Bailey, S. M., Meyne, J., Chen, D. J., Kurimasa, A., Li, G. C., Lehnert, B. E. und Goodwin, E. H. (1999). "DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14899-904.
- Balleg, B. J., Joseph, V., De, S., Sarek, G., Vannier, J. B., Stracker, T., Schrader, K. A., Small, T. N., O'Reilly, R., Manschreck, C., Harlan Fleischut, M. M., Zhang, L., Sullivan, J., Stratton, K., Yeager, M., Jacobs, K., Giri, N., Alter, B. P., Boland, J., Burdett, L., Offit, K., Boulton, S. J., Savage, S. A. und Petrini, J. H. (2013a). "A recessive founder mutation in regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, underlies severe immunodeficiency and features of Hoyeraal Hreidarsson syndrome." PLoS Genet **9**(8): e1003695.
- Balleg, B. J., Yeager, M., Jacobs, K., Giri, N., Boland, J., Burdett, L., Alter, B. P. und Savage, S. A. (2013b). "Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita." Hum Genet **132**(4): 473-80.
- Barber, L. J., Youds, J. L., Ward, J. D., McIlwraith, M. J., O'Neil, N. J., Petalcorin, M. I., Martin, J. S., Collis, S. J., Cantor, S. B., Auclair, M., Tissenbaum, H., West, S. C., Rose, A. M. und Boulton, S. J. (2008). "RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination." Cell **135**(2): 261-71.
- Beemster, G. T. und Baskin, T. I. (1998). "Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*." Plant Physiol **116**(4): 1515-26.
- Berchowitz, L. E., Francis, K. E., Bey, A. L. und Copenhaver, G. P. (2007). "The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*." PLoS Genet **3**(8): e132.
- Birrell, G. W., Brown, J. A., Wu, H. I., Giaever, G., Chu, A. M., Davis, R. W. und Brown, J. M. (2002). "Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to DNA-damaging agents does not identify the genes that protect against these agents." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8778-83.
- Blanck, S., Kobbe, D., Hartung, F., Fengler, K., Focke, M. und Puchta, H. (2009). "A SRS2 homolog from *Arabidopsis thaliana* disrupts recombinogenic DNA intermediates and facilitates single strand annealing." Nucleic Acids Res **37**(21): 7163-76.
- Blastyak, A., Pinter, L., Unk, I., Prakash, L., Prakash, S. und Haracska, L. (2007). "Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression." Mol Cell **28**(1): 167-75.
- Bleuyard, J. Y., Gallego, M. E. und White, C. I. (2006). "Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants." DNA Repair (Amst) **5**(1): 1-12.
- Bonnet, S. (2009). "Neue Ansätze zur Beeinflussung der homologen Rekombination bei Pflanzen." Botanisches Institut II, Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Britt, A. (2002). "Repair of damaged bases." Arabidopsis Book **1**: e0005.
- Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S. und Reddel, R. R. (1995). "Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity." EMBO J **14**(17): 4240-8.
- Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A. und Reddel, R. R. (1997). "Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines." Nat Med **3**(11): 1271-4.
- Celli, G. B. und de Lange, T. (2005). "DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion." Nat Cell Biol **7**(7): 712-8.
- Celli, G. B., Denchi, E. L. und de Lange, T. (2006). "Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination." Nat Cell Biol **8**(8): 885-90.
- Chaganti, R. S., Schonberg, S. und German, J. (1974). "A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(11): 4508-12.
- Chang, M., Bellaoui, M., Zhang, C., Desai, R., Morozov, P., Delgado-Cruzata, L., Rothstein, R., Freyer, G. A., Boone, C. und Brown, G. W. (2005). "RMI1/NCE4, a suppressor of

- genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex." *EMBO J* **24**(11): 2024-33.
- Chiolo, I., Saponaro, M., Baryshnikova, A., Kim, J. H., Seo, Y. S. und Liberi, G. (2007). "The human F-Box DNA helicase FBH1 faces *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 and postreplication repair pathway roles." *Mol Cell Biol* **27**(21): 7439-50.
- Chung, G., O'Neil, N. J. und Rose, A. M. (2011). "CHL-1 provides an essential function affecting cell proliferation and chromosome stability in *Caenorhabditis elegans*." *DNA Repair (Amst)* **10**(11): 1174-82.
- Crismani, W., Girard, C., Froger, N., Pradillo, M., Santos, J. L., Chelysheva, L., Copenhaver, G. P., Horlow, C. und Mercier, R. (2012). "FANCM limits meiotic crossovers." *Science* **336**(6088): 1588-90.
- Culligan, K., Tissier, A. und Britt, A. (2004). "ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* **16**(5): 1091-104.
- Daley, J. M., Kwon, Y., Niu, H. und Sung, P. (2013). "Investigations of homologous recombination pathways and their regulation." *Yale J Biol Med* **86**(4): 453-61.
- Dangel, N. J., Knoll, A. und Puchta, H. (2014). "MHF1 plays Fanconi anaemia complementation group M protein (FANCM)-dependent and FANCM-independent roles in DNA repair and homologous recombination in plants." *Plant J.*
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G. und Hoeijmakers, J. H. (1999). "Molecular mechanism of nucleotide excision repair." *Genes Dev* **13**(7): 768-85.
- de Lange, T. (2004). "T-loops and the origin of telomeres." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 323-9.
- de Lange, T. (2005). "Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres." *Genes Dev* **19**(18): 2100-10.
- Deng, Z., Glousker, G., Molczan, A., Fox, A. J., Lamm, N., Dheekollu, J., Weizman, O. E., Schertzer, M., Wang, Z., Vladimirova, O., Schug, J., Aker, M., Londono-Vallejo, A., Kaestner, K. H., Lieberman, P. M. und Tzfati, Y. (2013). "Inherited mutations in the helicase RTEL1 cause telomere dysfunction and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(36): E3408-16.
- Ding, H., Schertzer, M., Wu, X., Gertsenstein, M., Selig, S., Kammori, M., Pourvali, R., Poon, S., Vulto, I., Chavez, E., Tam, P. P., Nagy, A. und Lansdorp, P. M. (2004). "Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein." *Cell* **117**(7): 873-86.
- DuBois, M. L., Haimberger, Z. W., McIntosh, M. W. und Gottschling, D. E. (2002). "A quantitative assay for telomere protection in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **161**(3): 995-1013.
- Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L. und Reddel, R. R. (2000). "Telomere maintenance by recombination in human cells." *Nat Genet* **26**(4): 447-50.
- Dupaigne, P., Le Breton, C., Fabre, F., Gangloff, S., Le Cam, E. und Veaute, X. (2008). "The Srs2 helicase activity is stimulated by Rad51 filaments on dsDNA: implications for crossover incidence during mitotic recombination." *Mol Cell* **29**(2): 243-54.
- Egan, K. M., Thompson, R. C., Nabors, L. B., Olson, J. J., Brat, D. J., Larocca, R. V., Brem, S., Moots, P. L., Madden, M. H., Browning, J. E. und Ann Chen, Y. (2011). "Cancer susceptibility variants and the risk of adult glioma in a US case-control study." *J Neurooncol* **104**(2): 535-42.
- Ellis, N. A., Groden, J., Ye, T. Z., Straughen, J., Lennon, D. J., Ciocci, S., Proytcheva, M. und German, J. (1995). "The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases." *Cell* **83**(4): 655-66.
- Erzberger, J. P. und Berger, J. M. (2006). "Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**: 93-114.
- Essen, L. O. und Klar, T. (2006). "Light-driven DNA repair by photolyases." *Cell Mol Life Sci* **63**(11): 1266-77.

- Fausser, F., Schiml, S. und Puchta, H. (2014). "Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*." Plant J.
- Fitzgerald, M. S., Riha, K., Gao, F., Ren, S., McKnight, T. D. und Shippen, D. E. (1999). "Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14813-8.
- Fortini, P. und Dogliotti, E. (2007). "Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways." DNA Repair (Amst) **6**(4): 398-409.
- Gallego, M. E. und White, C. I. (2005). "DNA repair and recombination functions in *Arabidopsis* telomere maintenance." Chromosome Res **13**(5): 481-91.
- Gangloff, S., Soustelle, C. und Fabre, F. (2000). "Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases." Nat Genet **25**(2): 192-4.
- Garcia, V., Bruchet, H., Camescasse, D., Granier, F., Bouchez, D. und Tissier, A. (2003). "AtATM is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants." Plant Cell **15**(1): 119-32.
- Gari, K., Decaillet, C., Delannoy, M., Wu, L. und Constantinou, A. (2008a). "Remodeling of DNA replication structures by the branch point translocase FANCM." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(42): 16107-12.
- Gari, K., Decaillet, C., Stasiak, A. Z., Stasiak, A. und Constantinou, A. (2008b). "The Fanconi anemia protein FANCM can promote branch migration of Holliday junctions and replication forks." Mol Cell **29**(1): 141-8.
- Gerring, S. L., Spencer, F. und Hieter, P. (1990). "The CHL 1 (CTF 1) gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is important for chromosome transmission and normal cell cycle progression in G2/M." EMBO J **9**(13): 4347-58.
- Gillet, L. C. und Scharer, O. D. (2006). "Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair." Chem Rev **106**(2): 253-76.
- Gorbalenya, A. E. und Koonin, E. V. (1993). "Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships." Curr Opin Struct Biol **3**(3): 419-429.
- Grandin, N., Damon, C. und Charbonneau, M. (2001). "Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13." EMBO J **20**(5): 1173-83.
- Gravel, S., Chapman, J. R., Magill, C. und Jackson, S. P. (2008). "DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection." Genes Dev **22**(20): 2767-72.
- Haber, J. E. (1974). "Bisexual mating behavior in a diploid of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for genetically controlled non-random chromosome loss during vegetative growth." Genetics **78**(3): 843-58.
- Haber, J. E. und Heyer, W. D. (2001). "The fuss about Mus81." Cell **107**(5): 551-4.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z. und Maliga, P. (1994). "The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation." Plant Mol Biol **25**(6): 989-94.
- Hamilton, M. D., Nuara, A. A., Gammon, D. B., Buller, R. M. und Evans, D. H. (2007). "Duplex strand joining reactions catalyzed by vaccinia virus DNA polymerase." Nucleic Acids Res **35**(1): 143-51.
- Hanlon Newell, A. E., Hemphill, A., Akkari, Y. M., Hejna, J., Moses, R. E. und Olson, S. B. (2008). "Loss of homologous recombination or non-homologous end-joining leads to radial formation following DNA interstrand crosslink damage." Cytogenet Genome Res **121**(3-4): 174-80.
- Hartung, F., Plchova, H. und Puchta, H. (2000). "Molecular characterisation of RecQ homologues in *Arabidopsis thaliana*." Nucleic Acids Res **28**(21): 4275-82.
- Hartung, F. und Puchta, H. (2006). "The RecQ gene family in plants." J Plant Physiol **163**(3): 287-96.

- Hartung, F., Suer, S., Bergmann, T. und Puchta, H. (2006). "The role of AtMUS81 in DNA repair and its genetic interaction with the helicase AtRecQ4A." *Nucleic Acids Res* **34**(16): 4438-48.
- Hartung, F., Suer, S. und 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**(47): 18836-41.
- Hartung, F., Suer, S., Knoll, A., Wurz-Wildersinn, R. und Puchta, H. (2008). "Topoisomerase 3alpha and RMI1 suppress somatic crossovers and are essential for resolution of meiotic recombination intermediates in *Arabidopsis thaliana*." *PLoS Genet* **4**(12): e1000285.
- Hefferin, M. L. und Tomkinson, A. E. (2005). "Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining." *DNA Repair (Amst)* **4**(6): 639-48.
- Higgins, J. D., Ferdous, M., Osman, K. und Franklin, F. C. (2011). "The RecQ helicase AtRECQ4A is required to remove inter-chromosomal telomeric connections that arise during meiotic recombination in *Arabidopsis*." *Plant J* **65**(3): 492-502.
- Huber, M. D., Lee, D. C. und Maizels, N. (2002). "G4 DNA unwinding by BLM and Sgs1p: substrate specificity and substrate-specific inhibition." *Nucleic Acids Res* **30**(18): 3954-61.
- Inoue, A., Li, T., Roby, S. K., Valentine, M. B., Inoue, M., Boyd, K., Kidd, V. J. und Lahti, J. M. (2007). "Loss of ChlR1 helicase in mouse causes lethality due to the accumulation of aneuploid cells generated by cohesion defects and placental malformation." *Cell Cycle* **6**(13): 1646-54.
- Ivanov, E. L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J. und Haber, J. E. (1996). "Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **142**(3): 693-704.
- Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V. und Modrich, P. L. (2006). "DNA mismatch repair: functions and mechanisms." *Chem Rev* **106**(2): 302-23.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. und Charpentier, E. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *Science* **337**(6096): 816-21.
- Kim, J., Kim, J. H., Lee, S. H., Kim, D. H., Kang, H. Y., Bae, S. H., Pan, Z. Q. und Seo, Y. S. (2002). "The novel human DNA helicase hFBH1 is an F-box protein." *J Biol Chem* **277**(27): 24530-7.
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L. und Shay, J. W. (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." *Science* **266**(5193): 2011-5.
- Kirik, A., Salomon, S. und Puchta, H. (2000). "Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants." *EMBO J* **19**(20): 5562-6.
- Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R. W., Smithson, W. A., Lindor, N. M. und Furuichi, Y. (1999). "Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome." *Nat Genet* **22**(1): 82-4.
- Klein, H. L. (2001). "Mutations in recombinational repair and in checkpoint control genes suppress the lethal combination of srs2Delta with other DNA repair genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **157**(2): 557-65.
- 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 Institut für Technologie (KIT)*.
- Knoll, A. und Puchta, H. (2011). "The role of DNA helicases and their interaction partners in genome stability and meiotic recombination in plants." *J Exp Bot* **62**(5): 1565-79.
- Knoll, A., Higgins, J. D., Seeliger, K., Reha, S. J., Dangel, N. J., Bauknecht, M., Schropfer, S., Franklin, F. C. und Puchta, H. (2012). "The Fanconi anemia ortholog FANCM ensures ordered homologous recombination in both somatic and meiotic cells in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **24**(4): 1448-64.

- Knoll, A., Schropfer, S. und Puchta, H. (2014). "The RTR complex as caretaker of genome stability and its unique meiotic function in plants." *Front Plant Sci* **5**: 33.
- Kohzaki, M., Hatanaka, A., Sonoda, E., Yamazoe, M., Kikuchi, K., Vu Trung, N., Szuts, D., Sale, J. E., Shinagawa, H., Watanabe, M. und Takeda, S. (2007). "Cooperative roles of vertebrate Fbh1 and Blm DNA helicases in avoidance of crossovers during recombination initiated by replication fork collapse." *Mol Cell Biol* **27**(8): 2812-20.
- Lambert, S. und Lopez, B. S. (2000). "Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms." *EMBO J* **19**(12): 3090-9.
- Lawrence, C. W. und Christensen, R. B. (1979). "Metabolic suppressors of trimethoprim and ultraviolet light sensitivities of *Saccharomyces cerevisiae* rad6 mutants." *J Bacteriol* **139**(3): 866-76.
- Le Guen, T., Jullien, L., Touzot, F., Schertzer, M., Gaillard, L., Perderiset, M., Carpentier, W., Nitschke, P., Picard, C., Couillault, G., Soulier, J., Fischer, A., Callebaut, I., Jabado, N., Londono-Vallejo, A., de Villartay, J. P. und Revy, P. (2013). "Human RTEL1 deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability." *Hum Mol Genet* **22**(16): 3239-49.
- Lee, J. W. (2013). "Telomere shortening by mutations in the RTEL1 helicase cause severe form of dyskeratosis congenita, Hoyerall-Hreidarsson syndrome." *Clin Genet* **84**(3): 210.
- Lee, J. Y., Kozak, M., Martin, J. D., Pennock, E. und Johnson, F. B. (2007). "Evidence that a RecQ helicase slows senescence by resolving recombining telomeres." *PLoS Biol* **5**(6): e160.
- Lee, K. und Lee, S. E. (2007). "Saccharomyces cerevisiae Sae2- and Tel1-dependent single-strand DNA formation at DNA break promotes microhomology-mediated end joining." *Genetics* **176**(4): 2003-14.
- Lee, S. K., Johnson, R. E., Yu, S. L., Prakash, L. und Prakash, S. (1999). "Requirement of yeast SGS1 and SRS2 genes for replication and transcription." *Science* **286**(5448): 2339-42.
- Lin, F. L., Sperle, K. und Sternberg, N. (1984). "Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process." *Mol Cell Biol* **4**(6): 1020-34.
- Liu, Y., Prasad, R., Beard, W. A., Kedar, P. S., Hou, E. W., Shock, D. D. und Wilson, S. H. (2007). "Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/aprimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta." *J Biol Chem* **282**(18): 13532-41.
- Liu, Y., Shete, S., Etzel, C. J., Scheurer, M., Alexiou, G., Armstrong, G., Tsavachidis, S., Liang, F. W., Gilbert, M., Aldape, K., Armstrong, T., Houlston, R., Hosking, F., Robertson, L., Xiao, Y., Wiencke, J., Wrensch, M., Andersson, U., Melin, B. S. und Bondy, M. (2010). "Polymorphisms of LIG4, BTBD2, HMG A2, and RTEL1 genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival." *J Clin Oncol* **28**(14): 2467-74.
- Lobet, G., Pages, L. und Draye, X. (2011). "A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture." *Plant Physiol* **157**(1): 29-39.
- Lohman, T. M. und Bjornson, K. P. (1996). "Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding." *Annu Rev Biochem* **65**: 169-214.
- Lohman, T. M., Tomko, E. J. und Wu, C. G. (2008). "Non-hexameric DNA helicases and translocases: mechanisms and regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 391-401.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. und 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**(6): 781-94.
- Mannuss, A., Dukowic-Schulze, S., Suer, S., Hartung, F., Pacher, M. und Puchta, H. (2010). "RAD5A, RECQ4A, and MUS81 have specific functions in homologous recombination and define different pathways of DNA repair in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* **22**(10): 3318-30.

- Martinez, P. und Blasco, M. A. (2011). "Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins." *Nat Rev Cancer* **11**(3): 161-76.
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., 3rd, Hurov, K. E., Luo, J., Bakalarski, C. E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S. P. und Elledge, S. J. (2007). "ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage." *Science* **316**(5828): 1160-6.
- McClintock, B. (1939). "The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **25**(8): 405-16.
- Mimitou, E. P. und Symington, L. S. (2008). "Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing." *Nature* **455**(7214): 770-4.
- Miyajima, A., Seki, M., Onoda, F., Shiratori, M., Odagiri, N., Ohta, K., Kikuchi, Y., Ohno, Y. und Enomoto, T. (2000). "Sgs1 helicase activity is required for mitotic but apparently not for meiotic functions." *Mol Cell Biol* **20**(17): 6399-409.
- Miyake, Y., Nakamura, M., Nabetani, A., Shimamura, S., Tamura, M., Yonehara, S., Saito, M. und Ishikawa, F. (2009). "RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway." *Mol Cell* **36**(2): 193-206.
- Molinier, J., Ries, G., Bonhoeffler, S. und Hohn, B. (2004). "Interchromatid and interhomolog recombination in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* **16**(2): 342-52.
- Moore, K. J. und Lohman, T. M. (1995). "Helicase-catalyzed DNA unwinding: energy coupling by DNA motor proteins." *Biophys J* **68**(4 Suppl): 180S-184S; discussion 184S-185S.
- Morishita, T., Furukawa, F., Sakaguchi, C., Toda, T., Carr, A. M., Iwasaki, H. und Shinagawa, H. (2005). "Role of the *Schizosaccharomyces pombe* F-Box DNA helicase in processing recombination intermediates." *Mol Cell Biol* **25**(18): 8074-83.
- Mu, D. und Sancar, A. (1997). "Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans." *J Biol Chem* **272**(12): 7570-3.
- Mullen, J. R., Kaliraman, V. und Brill, S. J. (2000). "Bipartite structure of the SGS1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **154**(3): 1101-14.
- Nakayama, H., Nakayama, K., Nakayama, R., Irino, N., Nakayama, Y. und Hanawalt, P. C. (1984). "Isolation and genetic characterization of a thymineless death-resistant mutant of *Escherichia coli* K12: identification of a new mutation (recQ1) that blocks the RecF recombination pathway." *Mol Gen Genet* **195**(3): 474-80.
- Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W. R. und Gloor, G. B. (1994). "Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1613-25.
- Neumann, A. A., Watson, C. M., Noble, J. R., Pickett, H. A., Tam, P. P. und Reddel, R. R. (2013). "Alternative lengthening of telomeres in normal mammalian somatic cells." *Genes Dev* **27**(1): 18-23.
- Nimonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J. L., Wyman, C., Modrich, P. und 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**(4): 350-62.
- Ogiwara, H., Ui, A., Lai, M. S., Enomoto, T. und Seki, M. (2007). "Chl1 and Ctf4 are required for damage-induced recombinations." *Biochem Biophys Res Commun* **354**(1): 222-6.
- Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A. und Enomoto, T. (2000). "Elevation of sister chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae* sgs1 disruptants and the relevance of the disruptants as a system to evaluate mutations in Bloom's syndrome gene." *Mutat Res* **459**(3): 203-9.
- Palm, W. und de Lange, T. (2008). "How shelterin protects mammalian telomeres." *Annu Rev Genet* **42**: 301-34.
- Patel, S. S. und Donmez, I. (2006). "Mechanisms of helicases." *J Biol Chem* **281**(27): 18265-8.

- Petronczki, M., Chwalla, B., Siomos, M. F., Yokobayashi, S., Helmhart, W., Deutschbauer, A. M., Davis, R. W., Watanabe, Y. und Nasmyth, K. (2004). "Sister-chromatid cohesion mediated by the alternative RF-CCtf18/Dcc1/Ctf8, the helicase Chl1 and the polymerase-alpha-associated protein Ctf4 is essential for chromatid disjunction during meiosis II." *J Cell Sci* **117**(Pt 16): 3547-59.
- Prakash, R., Krejci, L., Van Komen, S., Anke Schurer, K., Kramer, W. und Sung, P. (2005a). "Saccharomyces cerevisiae MPH1 gene, required for homologous recombination-mediated mutation avoidance, encodes a 3' to 5' DNA helicase." *J Biol Chem* **280**(9): 7854-60.
- Prakash, S., Johnson, R. E. und Prakash, L. (2005b). "Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function." *Annu Rev Biochem* **74**: 317-53.
- Puchta, H. (2005). "The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution." *J Exp Bot* **56**(409): 1-14.
- Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H. K. und Hohn, B. (2000). "Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants." *Nature* **406**(6791): 98-101.
- Riha, K., McKnight, T. D., Griffing, L. R. und Shippen, D. E. (2001). "Living with genome instability: plant responses to telomere dysfunction." *Science* **291**(5509): 1797-800.
- Riha, K., Watson, J. M., Parkey, J. und Shippen, D. E. (2002). "Telomere length deregulation and enhanced sensitivity to genotoxic stress in Arabidopsis mutants deficient in Ku70." *EMBO J* **21**(11): 2819-26.
- Riha, K. und Shippen, D. E. (2003). "Ku is required for telomeric C-rich strand maintenance but not for end-to-end chromosome fusions in Arabidopsis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 611-5.
- Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B. (2003). "An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics." *Plant Mol Biol* **53**(1-2): 247-59.
- Rozan, L. M. und El-Deiry, W. S. (2007). "p53 downstream target genes and tumor suppression: a classical view in evolution." *Cell Death Differ* **14**(1): 3-9.
- Ruckova, E., Friml, J., Prochazkova Schrupfova, P. und Fajkus, J. (2008). "Role of alternative telomere lengthening unmasked in telomerase knock-out mutant plants." *Plant Mol Biol* **66**(6): 637-46.
- Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W. J., Stark, M. J. und White, M. F. (2006). "The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains." *Mol Cell* **23**(6): 801-8.
- Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H. W., Blasco, M., Gottlieb, G. J., Greider, C. und DePinho, R. A. (1999). "Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice." *Cell* **96**(5): 701-12.
- Scheller, J., Schurer, A., Rudolph, C., Hettwer, S. und Kramer, W. (2000). "MPH1, a yeast gene encoding a DEAH protein, plays a role in protection of the genome from spontaneous and chemically induced damage." *Genetics* **155**(3): 1069-81.
- Schröpfer, S., Kobbe, D., Hartung, F., Knoll, A. und Puchta, H. (2014). "Defining the roles of the N-terminal region and the helicase activity of RECQ4A in DNA repair and homologous recombination in Arabidopsis." *Nucleic Acids Res* **42**(3): 1684-97.
- Schürer, K. A., Rudolph, C., Ulrich, H. D. und Kramer, W. (2004). "Yeast MPH1 gene functions in an error-free DNA damage bypass pathway that requires genes from Homologous recombination, but not from postreplicative repair." *Genetics* **166**(4): 1673-86.
- Sfeir, A., Kosiyatrakul, S. T., Hockemeyer, D., MacRae, S. L., Karlseder, J., Schildkraut, C. L. und de Lange, T. (2009). "Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication." *Cell* **138**(1): 90-103.
- Sfeir, A. (2012). "Telomeres at a glance." *J Cell Sci* **125**(Pt 18): 4173-8.

- Siitonen, H. A., Kopra, O., Kaariainen, H., Haravuori, H., Winter, R. M., Saamanen, A. M., Peltonen, L. und Kestila, M. (2003). "Molecular defect of RAPADILINO syndrome expands the phenotype spectrum of RECQL diseases." *Hum Mol Genet* **12**(21): 2837-44.
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S. und Wigley, D. B. (2007). "Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases." *Annu Rev Biochem* **76**: 23-50.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. und Meyerowitz, E. M. (1990). "Early flower development in Arabidopsis." *Plant Cell* **2**(8): 755-67.
- Song, X., Leehy, K., Warrington, R. T., Lamb, J. C., Surovtseva, Y. V. und Shippen, D. E. (2008). "STN1 protects chromosome ends in Arabidopsis thaliana." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(50): 19815-20.
- Surovtseva, Y. V., Churikov, D., Boltz, K. A., Song, X., Lamb, J. C., Warrington, R., Leehy, K., Heacock, M., Price, C. M. und Shippen, D. E. (2009). "Conserved telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryotes." *Mol Cell* **36**(2): 207-18.
- Swoboda, P., Gal, S., Hohn, B. und Puchta, H. (1994). "Intrachromosomal homologous recombination in whole plants." *EMBO J* **13**(2): 484-9.
- Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J. und Stahl, F. W. (1983). "The double-strand-break repair model for recombination." *Cell* **33**(1): 25-35.
- Templeton, G. W. und Moorhead, G. B. (2005). "The phosphoinositide-3-OH-kinase-related kinases of Arabidopsis thaliana." *EMBO Rep* **6**(8): 723-8.
- Thaler, D. S. und Stahl, F. W. (1988). "DNA double-chain breaks in recombination of phage lambda and of yeast." *Annu Rev Genet* **22**: 169-97.
- Tuteja, N., Singh, M. B., Misra, M. K., Bhalla, P. L. und Tuteja, R. (2001). "Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**(4): 337-97.
- Unk, I., Hajdu, I., Blastyak, A. und Haracska, L. (2010). "Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTf and SHPRH in DNA damage tolerance." *DNA Repair (Amst)* **9**(3): 257-67.
- van der Lelij, P., Chrzanowska, K. H., Godthelp, B. C., Rooimans, M. A., Oostra, A. B., Stumm, M., Zdzienicka, M. Z., Joenje, H. und de Winter, J. P. (2010). "Warsaw breakage syndrome, a cohesinopathy associated with mutations in the XPD helicase family member DDX11/ChlR1." *Am J Hum Genet* **86**(2): 262-6.
- Van Maldergem, L., Siitonen, H. A., Jalkh, N., Chouery, E., De Roy, M., Delague, V., Muenke, M., Jabs, E. W., Cai, J., Wang, L. L., Plon, S. E., Fourneau, C., Kestila, M., Gillerot, Y., Megarbane, A. und Verloes, A. (2006). "Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene." *J Med Genet* **43**(2): 148-52.
- Vannier, J. B., Depeiges, A., White, C. und Gallego, M. E. (2009). "ERCC1/XPF protects short telomeres from homologous recombination in Arabidopsis thaliana." *PLoS Genet* **5**(2): e1000380.
- Vannier, J. B., Pavicic-Kaltenbrunner, V., Petalcorin, M. I., Ding, H. und Boulton, S. J. (2012). "RTEL1 dismantles T loops and counteracts telomeric G4-DNA to maintain telomere integrity." *Cell* **149**(4): 795-806.
- Vannier, J. B., Sandhu, S., Petalcorin, M. I., Wu, X., Nabi, Z., Ding, H. und Boulton, S. J. (2013). "RTEL1 is a replisome-associated helicase that promotes telomere and genome-wide replication." *Science* **342**(6155): 239-42.
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S. C., Le Cam, E. und Fabre, F. (2003). "The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments." *Nature* **423**(6937): 309-12.
- Walbot, V. (1985). "On the life strategies of plants and animals." *Trends Genet* **1**: 165-169.

- Walne, A. J., Vulliamy, T., Kirwan, M., Plagnol, V. und Dokal, I. (2013). "Constitutional mutations in RTEL1 cause severe dyskeratosis congenita." *Am J Hum Genet* **92**(3): 448-53.
- Wang, R. C., Smogorzewska, A. und de Lange, T. (2004). "Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres." *Cell* **119**(3): 355-68.
- Wang, W., Seki, M., Narita, Y., Sonoda, E., Takeda, S., Yamada, K., Masuko, T., Katada, T. und Enomoto, T. (2000). "Possible association of BLM in decreasing DNA double strand breaks during DNA replication." *EMBO J* **19**(13): 3428-35.
- Watt, P. M., Hickson, I. D., Borts, R. H. und Louis, E. J. (1996). "SGS1, a homologue of the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **144**(3): 935-45.
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W. und Shay, J. W. (1996). "Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells." *Dev Genet* **18**(2): 173-9.
- Wu, L. und Hickson, I. D. (2003). "The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination." *Nature* **426**(6968): 870-4.
- Yin, J., Sobeck, A., Xu, C., Meetei, A. R., Hoatlin, M., Li, L. und Wang, W. (2005). "BLAP75, an essential component of Bloom's syndrome protein complexes that maintain genome integrity." *EMBO J* **24**(7): 1465-76.
- Yoshiyama, K., Conklin, P. A., Huefner, N. D. und Britt, A. B. (2009). "Suppressor of gamma response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(31): 12843-8.
- Youds, J. L., Mets, D. G., McIlwraith, M. J., Martin, J. S., Ward, J. D., NJ, O. N., Rose, A. M., West, S. C., Meyer, B. J. und Boulton, S. J. (2010). "RTEL-1 enforces meiotic crossover interference and homeostasis." *Science* **327**(5970): 1254-8.
- Yu, C. E., Oshima, J., Fu, Y. H., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., Martin, G. M., Mulligan, J. und Schellenberg, G. D. (1996). "Positional cloning of the Werner's syndrome gene." *Science* **272**(5259): 258-62.
- Zellinger, B., Akimcheva, S., Puizina, J., Schirato, M. und Riha, K. (2007). "Ku suppresses formation of telomeric circles and alternative telomere lengthening in *Arabidopsis*." *Mol Cell* **27**(1): 163-9.
- Zhu, L., Hathcock, K. S., Hande, P., Lansdorp, P. M., Seldin, M. F. und Hodes, R. J. (1998). "Telomere length regulation in mice is linked to a novel chromosome locus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8648-53.
- Zhu, X. D., Niedernhofer, L., Kuster, B., Mann, M., Hoeymakers, J. H. und de Lange, T. (2003). "ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes." *Mol Cell* **12**(6): 1489-98.
- Zhu, Z., Chung, W. H., Shim, E. Y., Lee, S. E. und Ira, G. (2008). "Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends." *Cell* **134**(6): 981-94.

8 Anhang

Signifikanzniveau

Mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz wurde der p-Wert berechnet und das Signifikanzniveau ermittelt.

$P \geq 0,05$	nicht signifikant	ns
$0,01 < p < 0,05$	signifikant	*
$0,001 < p < 0,01$	sehr signifikant	**
$p < 0,0001$	höchst signifikant	***

Tabelle 8.1: Relative Expression von *ArTEEL1* in *rtel1-1*. Zur Normalisierung diente *Actin2*.

	vor T-DNA		über T-DNA		hinter T-DNA	
	WT	<i>rtel1-1</i>	WT	<i>rtel1-1</i>	WT	<i>rtel1-1</i>
Nr. 1	1	0,757900	1	0,000000	1	0,178700
Nr. 2	1	0,867500	1	0,000030	1	0,011000
Nr. 3	1	0,923400	1	0,015700	1	0,090900
Mittelwerte	1	0,849600	1	0,005243	1	0,093533
SD	0	0,084189	0	0,009056	0	0,083881

Tabelle 8.2: Rekombinationsrate von *rtel1-1*, den Komplementationslinien, *srs2-2*, *rtel1-1 srs2-2* und des Wildtyps. Alle Linien im IC9-Reporterhintergrund. Komplementationslinien. JR448-450: *rtel1-1::RTEL1*.

	WT	<i>rtel1-1</i>	JR448	JR449	JR450	<i>srs2-2</i>	<i>rtel1-1 srs2-2</i>
Versuch 1	0,28	2,56	0,13	0,32	0,44	0,15	1,80
Versuch 2	0,12	1,49	0,18	0,08	0,07	0,13	2,56
Versuch 3	0,13	1,43	0,05	0,10	0,13	0,25	2,10
Mittelwert	0,17	1,82	0,12	0,16	0,21	0,18	2,16
SD	0,09	0,64	0,06	0,13	0,20	0,07	0,38
T-Test gegen WT		0,04414	0,41396	0,9159	0,7766	0,98801	0,00951
T-Test gegen <i>rtel1-1</i>			0,04238	0,040994	0,03865	0,04515	0,49345

Tabelle 8.3: Rekombinationsrate von *rtel1-1*, *fancm-1*, *rtel1-1 fancm-1* und des Wildtyps. Alle Linien im IC9-Reporterhintergrund. Durchschnittliche Anzahl blauer Sektoren im Grundzustand, nach Bleomycin-Induktion (5 µg/ml) und nach *cis*-Platin-Induktion (3µM).

Grundzustand	WT	<i>rtel1-1</i>	<i>fancm-1</i>	<i>rtel1-1 fancm-1</i>
Versuch 1	0,18	2,38	0,20	4,80
Versuch 2	0,18	1,45	0,21	1,95
Versuch 3	0,10	0,90	0,13	2,90
Versuch 4	0,03	1,30	0,15	4,40
Versuch 5	0,30	2,00	0,13	4,23
Versuch 6	0,13	2,92	0,38	2,73
Versuch 7	0,05	1,53	0,20	3,08
Versuch 8	0,29	2,79	0,75	4,78
Mittelwert	0,16	1,91	0,27	3,61
Standardabweichung	0,10	0,74	0,21	1,07
T-Test gegen WT		0,0002406	0,2078476	0,0000371
T-Test gegen <i>rtel1-1</i>			0,0002799	0,0029440

Bleomycin	WT	<i>rtel1-1</i>	<i>fancm-1</i>	<i>rtel1-1 fancm-1</i>
Versuch 1	10,59	4,75	3,60	6,25
Versuch 2	7,48	2,65	1,21	4,23
Versuch 3	6,75	3,10	4,83	5,18
Versuch 4	4,23	4,08	3,90	6,05
Versuch 5	5,30	4,98	3,28	6,85
Versuch 6	5,20	3,83	5,71	5,61
Versuch 7				
Versuch 8				
Mittelwert	6,59	3,90	3,75	5,69
Standardabweichung	2,28	0,91	1,53	0,92
T-Test gegen WT		0,0331934	0,0329025	0,4032301
T-Test gegen <i>rtel1-1</i>			0,8478191	0,0066533

<i>cis</i> -Platin	WT	<i>rtel1-1</i>	<i>fancm-1</i>	<i>rtel1-1 fancm-1</i>
Versuch 1	0,61	1,60	0,26	4,15
Versuch 2	0,22	1,24	0,23	2,98
Versuch 3	0,36	1,03	0,34	2,76
Versuch 4	0,40	1,50	0,25	3,50
Versuch 5	0,70	2,73	0,45	2,60
Versuch 6	0,23	2,25	0,18	2,83
Versuch 7	0,51	1,97	0,55	4,08
Versuch 8	0,56	2,30	0,45	2,73
Mittelwert	0,45	1,83	0,34	3,20
Standardabweichung	0,18	0,58	0,13	0,62
T-Test gegen WT		0,0001819	0,1797949	0,0000019
T-Test gegen <i>rtel1-1</i>			0,0001288	0,0004585

Tabelle 8.4: Relatives Frischgewicht [%] von *rtel1-1*, *fancm-1*, *rtel1-1 fancm-1* und des Wildtyps nach MMC-Behandlung (5, 10, 15, 20 µg/ml).

MMC [µg/ml]	WT				<i>rtel1-1</i>			
	5	10	15	20	5	10	15	20
Versuch 1	92,33	83,10	64,96	62,49	80,71	70,84	63,19	60,20
Versuch 2	91,12	80,16	58,14	60,68	61,94	51,56	41,63	35,16
Versuch 3	89,92	89,60	56,50	52,77	74,40	71,45	51,09	48,85
Versuch 4	83,75	72,18	59,64	42,79	86,93	65,05	60,59	45,84
Mittelwert	89,28	81,26	59,81	54,68	76,00	64,73	54,13	47,51
SD	3,82	7,23	3,67	8,98	10,67	9,24	9,82	10,30
T-Test gegen WT					0,08330	0,03230	0,34194	0,33504
T-Test gegen <i>fancm-1</i>					0,66813	0,39005	0,54859	0,84983

MMC [µg/ml]	<i>fancm-1</i>				<i>rtel1-1 fancm-1</i>			
	5	10	15	20	5	10	15	20
Versuch 1	82,29	75,97	67,19	64,62	72,08	53,47	36,30	38,01
Versuch 2	65,34	56,76	38,49	28,08	58,24	41,39	34,00	24,98
Versuch 3	86,50	83,58	64,92	60,28	72,36	54,72	43,33	
Versuch 4	82,71	69,78	67,98	44,86	52,19	39,05	30,28	28,09
Mittelwert	79,21	71,52	59,64	49,46	63,72	47,16	35,98	30,36
SD	9,44	11,34	14,16	16,59	10,13	8,09	5,49	6,80
T-Test gegen WT	0,11972	0,20629	0,98301	0,60528	0,01012	0,00079	0,00066	0,00966
T-Test gegen <i>rtel1-1</i>	0,66813	0,39005	0,54859	0,84983	0,14633	0,02928	0,02541	0,04571
T-Test gegen <i>fancm-1</i>					0,06675	0,01516	0,03715	0,10285

Tabelle 8.5: Relatives Frischgewicht [%] von *rtel1-1*, *mus81-1*, *rtel1-1 mus81-1* und des Wildtyps nach MMC-Behandlung (5, 10, 15, 20 µg/ml).

MMC [µg/ml]	WT				<i>rtel1-1</i>			
	5	10	15	20	5	10	15	20
Versuch 1	91,12	80,16	58,14	60,68	61,94	51,56	41,63	35,16
Versuch 2	89,92	89,60	56,50	52,77	74,40	71,45	51,09	48,85
Versuch 3	83,75	72,18	59,64	42,79	86,93	65,05	60,59	45,84
Mittelwert	88,27	80,65	58,09	52,08	74,42	62,69	51,11	43,28
SD	3,95	8,72	1,57	8,96	12,49	10,15	9,48	7,20
T-Test gegen WT					0,1875	0,0823	0,3294	0,2587

MMC [µg/ml]	<i>mus81-1</i>				<i>rtel1-1 mus81-1</i>			
	5	10	15	20	5	10	15	20
Versuch 1	28,21	15,17	16,23	15,04	46,33	24,28	20,94	22,72
Versuch 2	43,84	31,30	32,68	17,26	49,31	29,55	27,10	22,53
Versuch 3	41,21	20,42	22,36	21,27	33,23	25,08	20,46	18,00
Mittelwert	37,75	22,30	23,76	17,86	42,95	26,30	22,83	21,08
SD	8,37	8,23	8,31	3,16	8,55	2,84	3,70	2,67
T-Test gegen WT	0,00309	0,00110	0,01629	0,01409	0,00457	0,00472	0,00109	0,01975
T-Test gegen <i>rtel1-1</i>	0,00326	0,00167	0,00741	0,00690	0,02800	0,01886	0,02363	0,02253
T-Test gegen <i>mus81-1</i>					0,49352	0,49501	0,87245	0,24981

Tabelle 8.6: Relatives Frischgewicht [%] von *rtel1-1*, der Komplementationslinien JR448-450 und des Wildtyps nach *cis*-Platin-Behandlung (5: 7,5; 8,5; 10 μ M). Komplementationslinien JR448-449: *rtel1-1::RTEL1*.

<i>cis</i> -Platin [μ M]	WT				<i>rtel1-1</i>			
	5	7,5	8,5	10	5	7,5	8,5	10
Versuch 1	94,56	93,76	89,28	83,28	86,44	76,23	59,24	62,32
Versuch 2	93,94	91,44	86,33	109,00	82,08	85,78	70,03	60,15
Versuch 3	91,6	87,9	79,9	67,8	62,8	65,2	54,5	60,2
Versuch 4	98,71	73,60	84,33	71,30	86,91	43,64	69,82	41,21
Versuch 5	91,14	89,00	67,95	74,54	73,80	61,99	58,41	49,55
Mittelwert	93,99	87,14	81,56	81,19	78,41	66,57	62,40	54,69
SD	3,02	7,90	8,34	16,57	10,18	15,90	7,10	9,04
T-Test gegen WT					0,02	0,04	0,00	0,02

<i>cis</i> -Platin [μ M]	JR448				JR449			
	5	7,5	8,5	10	5	7,5	8,5	10
Versuch 1	91,80	82,72	85,21	86,41	98,92	89,55	93,23	86,66
Versuch 2	102,86	97,14	72,22	86,27	90,79	76,76	85,61	78,52
Versuch 3	92,5	86,2	72,9	74,0	81,5	87,7	80,3	87,4
Versuch 4	97,92	89,13	93,57	91,68	91,36	88,68	90,47	85,30
Versuch 5	104,14	83,06	93,02	95,60	99,63	92,62	89,08	76,66
Mittelwert	97,85	87,65	83,39	86,79	92,45	87,06	87,73	82,91
SD	5,69	5,91	10,42	8,15	7,35	6,04	5,00	4,96
T-Test gegen WT	0,22776	0,91111	0,76822	0,52342	0,68210	0,98629	0,20198	0,83319

<i>cis</i> -Platin [μ M]	JR450			
	5	7,5	8,5	10
Versuch 1	97,06	94,80	86,33	88,66
Versuch 2	102,05	79,24	89,01	91,34
Versuch 3	79,7	91,2	81,3	73,6
Versuch 4	86,98	97,48	85,48	77,85
Versuch 5	95,70	80,93	88,78	76,60
Mittelwert	92,29	88,74	86,17	81,61
SD	8,90	8,22	3,14	7,87
T-Test gegen WT	0,70399	0,76195	0,29838	0,96058

Tabelle 8.7: Relatives Frischgewicht [%] von *rtel1-1*, *fancm-1*, *rtel1-1 fancm-1*, *mus81-1*, *rtel1-1 mus81-1* und des Wildtyps nach *cis*-Platin-Behandlung (5; 7,5; 8,5; 10 μ M).

<i>cis</i> -Platin [μ M]	WT				<i>rtel1-1</i>			
	5	7,5	8,5	10	5	7,5	8,5	10
Versuch 1	94,56	93,76	89,28	83,28	86,44	76,23	59,24	62,32
Versuch 2	93,94	91,44	86,33	109,00	82,08	85,78	70,03	60,15
Versuch 3	91,6	87,9	79,9	67,8	62,8	65,2	54,5	60,2
Versuch 4	98,71	73,60	84,33	71,30	86,91	43,64	69,82	41,21
Versuch 5	91,14	89,00	67,95	74,54	73,80	61,99	58,41	49,55
Versuch 6	104,28	95,11	97,15	88,39	80,15	53,22	59,09	61,65
Versuch 7	99,91	86,97	98,19	87,75	81,63	69,35	75,07	65,01
Versuch 8	100,08	91,23	86,22	96,07	89,68	79,56	80,56	76,95
Mittelwert	93,99	87,14	81,56	81,19	78,41	66,57	62,40	54,69
SD	3,02	7,90	8,34	16,57	10,18	15,90	7,10	9,04
T-Test gegen WT					0,00068	0,00260	0,00075	0,00120
T-Test gegen <i>rtel1-1 fancm-1</i>					0,01235	0,03456	0,00172	0,00064
T-Test gegen <i>rtel1-1 mus81-1</i>					0,00001	0,00071	0,00002	0,00007

<i>cis</i> -Platin [μ M]	<i>fancm-1</i>				<i>rtel1-1 fancm-1</i>			
	5	7,5	8,5	10	5	7,5	8,5	10
Versuch 1	83,48	75,56	78,06	69,83	72,86	56,04	50,44	41,15
Versuch 2	94,14	85,04	97,46	71,30	74,70	59,93	62,11	53,20
Versuch 3	96,0	90,5	93,2	90,9	46,1	43,8	32,0	31,0
Versuch 4	86,55	82,81	80,27	76,98	62,22	47,08	46,56	33,32
Versuch 5	96,88	96,71	76,84	83,81	80,00	62,92	46,30	44,70
Versuch 6	100,82	76,46	75,52	57,46	61,98	37,19	38,55	26,30
Versuch 7	77,77	66,52	71,93	24,55	71,93	48,83	57,75	43,57
Versuch 8	87,17	75,52	75,84	65,16	47,54	64,67	30,15	29,61
Mittelwert	90,35	81,14	81,14	67,50	64,66	52,56	45,49	37,86
StabW	7,82	9,61	9,14	20,26	12,58	9,84	11,45	9,21
T-Test gegen WT	0,07032	0,09461	0,30206	0,06846	0,00009	0,00000	0,00000	0,00000
T-Test gegen <i>rtel1-1 fancm-1</i>	0,00039	0,00004	0,00001	0,00384				

<i>cis</i> -Platin [μ M]	<i>mus81-1</i>				<i>rtel1-1 mus81-1</i>			
	5	7,5	8,5	10	5	7,5	8,5	10
Versuch 1	61,05	52,99	40,03	36,57	56,61	49,47	40,74	35,71
Versuch 2	68,47	56,48	65,13	49,11	57,30	48,41	44,61	38,80
Versuch 3	62,7	44,1	53,9	44,3	46,5	29,4	28,3	26,7
Versuch 4	61,05	52,99	40,03	36,57	56,61	49,47	40,74	35,71
Versuch 5	68,47	56,48	65,13	49,11	57,30	48,41	44,61	38,80
Versuch 6	62,65	44,09	53,88	44,32	46,52	29,41	28,34	26,74
Versuch 7	59,87	43,37	43,00	25,58	49,66	32,55	36,58	23,49
Versuch 8	66,45	32,33	55,18	42,12	65,62	33,71	44,04	38,65
Mittelwert	63,83	47,85	52,03	40,96	54,52	40,11	38,50	33,08
SD	3,46	8,38	10,21	7,85	6,53	9,56	6,82	6,36
T-Test gegen WT	0,00000	0,00000	0,00001	0,00001	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
T-Test gegen <i>rtel1-1 mus81-1</i>	0,00468	0,10713	0,00872	0,04536				

Tabelle 8.8: Durchschnittliche Anzahl der Samen pro Schote bei *rtel1-1*, *mus81-1*, *rtel1-1 mus81-1*, dem Wildtyp und den Komplementationslinien JR448-449. Komplementationslinien JR448-449: *rtel1-1::RTEL1*

	WT	<i>rtel1-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>rtel1-1 mus81-1</i>	JR448	JR449	JR450
Mittelwert Pfl. 1	41,50	20,33	37,00	2,33	47,60	39,20	37,80
Mittelwert Pfl. 2	37,50	22,17	37,50	3,17	45,40	38,60	40,80
Mittelwert Pfl. 3	50,17	25,83	36,50	6,50	42,80	44,20	38,40
Mittelwert Pfl. 4	44,50	23,67	29,50	6,67	42,00	39,60	38,40
Mittelwert Pfl. 5	46,00	27,67	18,67	5,17	47,00	42,60	43,40
Mittelwert Pfl. 6	44,00	35,17		2,80			
Mittelwert Pfl. 7	46,00	31,00		4,00			
Mittelwert Pfl. 8	38,33	24,67		10,33			
Mittelwert Pfl. 9	51,00	34,50		9,00			
Mittelwert Pfl. 10	48,83	35,00		7,00			
Mittelwert gesamt	44,78	28,00	31,83	5,70	44,96	40,84	39,76
SD	4,63	5,57	8,05	2,69	2,49	2,43	2,34

Tabelle 8.9: Rückkreuzung von *rtel1-1 mus81-1* mit dem Wildtyp. JR548: WT (♀) x *rtel1-1 mus81-1* (♂); JR549: WT (♂) x *rtel1-1 mus81-1* (♀).

Schote	WT (♀)	WT (♂)	WT x WT
	x <i>rtel1-1 mus81-1</i> (♂) (JR548)	x <i>rtel1-1 mus81-1</i> (♀) (JR549)	
1	0	0	18
2	2	10	25
3	0	18	10
4	2	0	26
5	0	0	1
6	12	0	13
7	0	0	26
8	0	0	1
9	0	0	29
10	17	0	42
11	5	0	7
12	0	0	6
13	0	0	1
14	1	0	2
15	24	0	0
16	0		0
17	0		0
18	0		4
19	0		1
20	0		
21	0		
22	0		
23	0		
24	0		
25	0		
Mittelwert	2,52	1,87	11,16
SD	6,07	5,15	12,73

Tabelle 8.10: Flächeninhalt [mm²] der Antheren von *rtel1-1*, *mus81-1*, *rtel1-1 mus81-1* und des Wildtyps.

Antheren	WT [mm ²]	<i>rtel1-1</i> [mm ²]	<i>rtel1-1 mus81-1</i> [mm ²]	<i>mus81-1</i> [mm ²]
1	0,151	0,085	0,069	0,104
2	0,112	0,122	0,074	0,099
3	0,127	0,094	0,055	0,105
4	0,149	0,118	0,062	0,098
5	0,137	0,080	0,059	0,095
6	0,138	0,089	0,078	0,106
7	0,131	0,109	0,083	0,102
8	0,123	0,100	0,094	0,098
9	0,114	0,103	0,125	0,108
10	0,141	0,095	0,083	0,111
11	0,139	0,111	0,093	0,113
12	0,123	0,106	0,098	0,105
14	0,105	0,107	0,094	0,078
15	0,110	0,106	0,071	0,126
16	0,110	0,096	0,087	0,102
17	0,119	0,151	0,067	0,082
18	0,105	0,140	0,113	0,110
19	0,113	0,066	0,107	0,094
20	0,108	0,091	0,066	0,123
21	0,109	0,077	0,117	0,092
22	0,115	0,064	0,107	0,102
23	0,123	0,063	0,075	0,074
24	0,145	0,056	0,057	0,101
25	0,137	0,048	0,065	0,106
26	0,141	0,065	0,082	0,096
27	0,138	0,085	0,067	0,092
28	0,144	0,068	0,073	0,123
29	0,142	0,045	0,09	0,114
30	0,101	0,086	0,11	0,062
Mittelwert [mm²]	0,126	0,091	0,084	0,101
SD	0,015	0,026	0,019	0,014
T-Test gegen WT		0,0000001	0,0000000	0,0000000

Tabelle 8.11: Wurzellänge [cm] nach einer Woche Anzucht.

Wurzel	WT	<i>rtel1-1</i>	<i>recq4A-1</i>	<i>rtel1-1</i> <i>recq4A-1</i>	<i>fancm-1</i>	<i>rtel1-1</i> <i>fancm-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>rtel1-1</i> <i>mus81-1</i>
1	5,09	2,57	5,59	0,86	6,44	4,69	4,16	2,67
2	4,50	4,15	6,08	0,74	5,99	4,90	4,19	2,32
3	5,05	3,06	7,27	0,50	6,51	2,74	4,87	2,45
4	3,49	2,78	6,25	0,70	5,41	3,98	2,17	2,37
5	5,65	3,34	7,54	0,82	6,26	2,72	5,34	1,63
6	5,24	2,85	5,68	1,29	5,75	5,57	2,26	1,96
7	6,08	3,54	6,74	0,51	4,61	2,84	3,11	0,30
8	5,99	4,96	7,44	0,83	5,51	3,67	4,72	1,70
9	5,98	2,83	6,78	0,24	6,18	3,57	4,80	1,83
10	5,08	2,34	5,68	0,39	5,91	3,34	2,18	1,19
11	4,52	3,93	6,12	0,86	5,12	3,37	3,49	1,93
12	5,16	3,69	6,12	0,39	4,79	2,53	3,02	2,38
13	4,89	2,35	5,11	0,65	5,98	3,60	4,01	1,56
14	4,57	3,59	6,75	0,95	5,27	3,07	3,64	1,78
15	4,31	3,46	6,46	1,44	6,55	4,68	4,99	2,41
16	4,87	3,11	4,57	1,34	5,15	3,70	3,59	2,52
17	3,53	4,11	4,26	1,41	4,39	3,86	3,88	1,71
18	4,81	4,24	5,00	1,43	7,60	3,59	5,12	1,37
19	4,08	3,26	4,58	1,43	7,32	3,64	4,59	1,05
20	3,81	4,66	4,97	2,06	6,38	4,32	5,15	1,48
21	5,13	3,19	4,35	2,03	4,96	4,50	1,22	1,94
22	5,83	1,75	4,11	0,27	7,08	3,94	1,89	2,19
23	4,82	4,86	3,67	0,85	3,19	2,84	2,28	1,86
24	5,90	3,52	5,17	0,43	3,96	2,79	3,58	1,83
25	5,58	2,34	2,97	0,67	4,46	3,84	2,03	1,34
26	6,31	2,99	3,97	0,88	4,14	4,74	1,75	1,69
27	6,25	4,33	2,46	0,90	5,70	3,83	3,37	1,56
28	5,88	3,98	3,78	0,52	7,01	5,03	0,74	2,51
29	5,88	4,35	4,57	0,48	6,45	4,91	2,27	2,10
30	6,21	3,41	4,21	0,45	6,81	4,45	1,34	2,07
31	4,81	3,07	4,33	0,80	5,15	5,48	3,05	1,02
32	4,28	3,22	4,66	0,96		3,08		1,06
33	4,82	4,47	4,35	1,14		2,90		1,34
34	4,79	4,55	3,34	0,94		4,04		1,43
35	4,83	4,31	4,66	1,11		4,15		
36	4,46	3,62	3,85	1,02				
37	5,50	4,03	3,37	1,27				
38	5,93	1,45		1,00				
39	6,92	2,78		0,86				
40	7,84	3,27		0,65				
Mittelwert	5,22	3,46	5,05	0,90	5,68	3,85	3,32	1,78
SD	0,90	0,83	1,30	0,43	1,06	0,82	1,31	0,53

Tabelle 8.12: Wurzellänge der Komplementationlinien sowie der F4- und F5-Generation von *rtell-1*, *tert*, *rtell-1 tert* und des Wildtyps. Wurzellänge nach einer Woche Anzucht in [cm]. JR448-450: *rtell-1::RTEL1*.

Wurzel				F4				F5			
	JR448	JR449	JR450	WT	<i>tert</i>	<i>rtell-1</i>	<i>rtell-1 tert</i>	WT	<i>tert</i>	<i>rtell-1</i>	<i>rtell-1 tert</i>
1	5,4	6,31	4,73	5,47	3,36	3,95	2,88	4,83	4,92	3,64	2,12
2	6,73	5,09	4	4,79	3,34	3,73	2,82	4,69	5,03	4,22	2,23
3	5,48	5,23	3,9	4,17	3,32	3,56	2,84	4,43	5,70	4,33	1,84
4	5,34	4,84	4,33	4,38	3,41	3,96	3,41	5,32	3,96	4,31	1,46
5	5,59	4,5	3,02	4,34	4,20	3,70	2,18	4,48	4,82	4,44	3,70
6	5,95	6,17	4,23	4,03	3,68	3,28	4,01	5,41	4,91	4,42	2,33
7	5,35	5,54	3,56	5,05	3,50	3,75	3,08	4,38	4,55	3,44	2,04
8	6,68	6,14	3,97	4,65	4,64	4,11	3,46	4,90	3,31	3,95	2,43
9	6,37	5,17	3,81	5,53	3,66	3,82	3,92	5,28	2,72	4,17	2,96
10	6,5	6,05	2,63	4,74	4,00	3,29	3,86	5,22	3,58	3,57	1,43
11	5,68	4,14	3,88	4,78	3,49	3,72	3,91	4,60	3,85	4,02	1,44
12	6,57	2,97	3,84	5,73	5,15	1,51	4,16	4,52	5,37	3,99	2,00
13	7,6	2,86	3,75	5,00	4,60	2,58	3,72	5,60	4,60	4,30	2,52
14	6,84	4,29	3,97	4,16	5,37	2,17	4,27	5,70	5,15	4,18	1,51
15	3,69	4,25	3,3	4,01	4,55	2,92	3,13	5,66	5,17	4,31	2,15
16	4,26	5,64	5,75	5,45	3,75	1,17	2,75	5,35	5,71	4,55	2,81
17	4,3	6,28	5,29	5,05	3,38	4,11	2,79	4,86	4,96	3,66	0,13
18	4,24	5,31	4,94	4,85	4,92	4,14	2,65	4,13	4,92	4,46	1,37
19	3,79	5,6	4,59	4,11	5,04	3,19	4,46	4,94	5,22	2,86	1,21
20	3,96	5,17	4,69	4,48	3,75	3,90	3,42	5,67	5,34	3,75	1,03
21	3,51	5,31	4,92	4,98	4,40	3,03	3,51	5,44	5,15	4,34	0,78
22	3,67	5,23	5,01	4,61	3,99	4,18	4,25	6,17	5,01	4,20	0,91
23	4,12	6,5	2,52	4,50	3,96	3,81	1,96	4,08	4,72	3,93	3,43
24	3,59	5,48	2,45	4,04	4,08	3,82	3,94	3,78	4,86	4,15	2,15
25	3,74	5,21	4,22	4,16	4,61	4,24	3,22	3,74	4,96	3,78	0,22
26	3,88	6,09	4,63	4,43	5,33	3,74	2,58	4,32	4,70	3,18	2,03
27	3,88	4,31	5,09	5,41	4,25	3,01	2,69	3,01	4,89	3,26	0,95
28	3,74	5,5	4,72	4,47	4,31	3,11	4,68	3,88	3,08	2,32	2,28
29	3,55	5,45	5,4	4,64		3,03	4,00	4,16	3,94	3,93	2,14
30	2,87	5,11	4,65	4,49			4,77	3,27			2,22
31	3,37	5,32	2,84	4,71				3,50			1,87
32	3,04	4,69	5,05								
33	4,77	4,84	5,32								
34	5,44	4,67	4,74								
35	4,07	4,97	5,37								
36	3,13	5,37	5,26								
37	4,46	5	5,74								
38	4,03	4,41	5,76								
39	4,18	4,24	5,37								
40	5,59		5,15								
Mittelwert	4,72	5,11	4,41	4,68	4,14	3,40	3,44	4,69	4,66	3,92	1,86
SD	1,24	0,81	0,91	0,48	0,64	0,76	0,74	0,79	0,75	0,52	0,82

Tabelle 8.13: Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem im Grundzustand. Die verschiedenen Arten an toten Stammzellen (SZ), die ausgewertet wurden, sind in der Tabelle angegeben. JR448-450: *rte1-1::RTEL1*.

	WT [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	0,00	0,00	12,50	4,17	7,22
TA-Zellen	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
andere SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>rte1-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	66,67	50,00	22,22	46,30	22,45
TA-Zellen	16,67	33,33	22,22	24,07	8,49
andere SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	JR448 [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	0,00	16,67	0,00	5,56	9,62
TA-Zellen	0,00	33,33	0,00	11,11	19,25
andere SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	JR449 [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	0,00	20,00	0,00	6,67	11,55
TA-Zellen	0,00	20,00	0,00	6,67	11,55
andere SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	JR449 [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TA-Zellen	0,00	50,00	0,00	16,67	28,87
andere SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 8.14: Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem nach *cis*-Platin-Induktion. Die verschiedenen Arten an toten Stammzellen (SZ), die ausgewertet wurden, sind in der Tabelle angegeben. JR448-450: *rtel1-1::RTEL1*.

	WT [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	16,67	0,00	44,44	20,37	22,45
TA-Zellen	0,00	0,00	55,56	18,52	32,08
andere SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>rtel1-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	100,00	100,00	75,00	91,67	14,43
TA-Zellen	100,00	77,78	100,00	92,59	12,83
andere SZ	16,67	22,22	75,00	37,96	32,20
veränderte SZN	0,00	0,00	37,50	12,50	21,65
	JR448 [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	33,33	0,00	44,44	25,93	23,13
TA-Zellen	0,00	0,00	44,44	14,81	25,66
andere SZ	0,00	0,00	22,22	7,41	12,83
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	JR449 [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	0,00	25,00	55,56	26,85	27,82
TA-Zellen	16,67	0,00	100,00	38,89	53,58
andere SZ	16,67	0,00	33,33	16,67	16,67
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	JR449 [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	0,00	0,00	55,56	18,52	32,08
TA-Zellen	20,00	50,00	66,67	45,56	23,65
andere SZ	0,00	0,00	33,33	11,11	19,25
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 8.15: Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem im Grundzustand. Die verschiedenen Arten an toten Stammzellen (SZ), die ausgewertet wurden, sind in der Tabelle angegeben.

	WT [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	16,67	0,00	12,50	9,72	8,67
TA-Zellen	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
andere SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>rtel1-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	42,86	83,33	22,22	49,47	31,09
TA-Zellen	42,86	83,33	22,22	49,47	31,09
andere SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	14,29	0,00	0,00	4,76	8,25
	<i>fancm-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	0,00	16,67	11,11	9,26	8,49
TA-Zellen	0,00	33,33	11,11	14,81	16,97
andere SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>rtel1-1 fancm-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	83,33	83,33	88,89	85,19	3,21
TA-Zellen	83,33	66,67	100,00	83,33	16,67
andere SZ	16,67	16,67	0,00	11,11	9,62
veränderte SZN	16,67	50,00	11,11	25,93	21,03
	<i>mus81-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	33,33	57,14	75,00	55,16	20,90
TA-Zellen	66,67	57,14	50,00	57,94	8,36
andere SZ	83,33	14,29	25,00	40,87	37,16
veränderte SZN	16,67	28,57	0,00	15,08	14,35
	<i>rtel1-1 mus81-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	50,00	85,71	87,50	74,40	21,15
TA-Zellen	100,00	85,71	100,00	95,24	8,25
andere SZ	0,00	28,57	37,50	22,02	19,59
veränderte SZN	50,00	28,57	50,00	42,86	12,37

Tabelle 8.16: Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem nach *cis*-Platin-Induktion. Die verschiedenen Arten an toten Stammzellen (SZ), die ausgewertet wurden, sind in der Tabelle angegeben.

	WT [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	28,57	0,00	44,44	24,34	22,52
TA-Zellen	28,57	0,00	55,56	28,04	27,78
andere SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>rtel1-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	85,71	80,00	75,00	80,24	5,36
TA-Zellen	71,43	100,00	100,00	90,48	16,50
andere SZ	14,29	20,00	75,00	36,43	33,53
veränderte SZN	0,00	20,00	37,50	19,17	18,76
	<i>fancm-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	0,00	14,29	75,00	29,76	39,82
TA-Zellen	33,33	42,86	100,00	58,73	36,06
andere SZ	0,00	0,00	87,50	29,17	50,52
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>rtel1-1 fancm-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
TA-Zellen	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
andere SZ	40,00	33,33	88,89	54,07	30,33
veränderte SZN	20,00	16,67	11,11	15,93	4,49
	<i>mus81-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	66,67	71,43	100,00	79,37	18,03
TA-Zellen	100,00	85,71	100,00	95,24	8,25
andere SZ	33,33	28,57	88,89	50,26	33,53
veränderte SZN	33,33	14,29	11,11	19,58	12,02
	<i>rtel1-1 mus81-1</i> [%]			Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 3		
vaskuläre SZ	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
TA-Zellen	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
andere SZ	40,00	42,86	100,00	60,95	33,85
veränderte SZN	40,00	57,14	50,00	49,05	8,61

Tabelle 8.17: : Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem im Grundzustand in der F4- und F5-Generation von *rtell-1*, *tert*, *rtell-1 tert* und des Wildtyps. Die verschiedenen Arten an toten Stammzellen (SZ), die ausgewertet wurden, sind in der Tabelle angegeben.

Grundzustand	F4				F5			
	WT [%]		Mittelwert [%]	SD	WT [%]		Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2			Durchgang 1	Durchgang 2		
vaskuläre SZ	0,00	12,50	6,25	8,84	0,00	0,00	0,00	0,00
TA-Zellen	14,29	0,00	7,14	10,10	0,00	0,00	0,00	0,00
andere SZ	0,00	12,50	6,25	8,84	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>tert</i> [%]		Mittelwert [%]	SD	<i>tert</i> [%]		Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2			Durchgang 1	Durchgang 2		
	vaskuläre SZ	20,00	12,50	16,25	5,30	12,50	0,00	6,25
TA-Zellen	40,00	12,50	26,25	19,45	0,00	14,29	7,14	10,10
andere SZ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>rtell-1</i> [%]		Mittelwert [%]	SD	<i>rtell-1</i> [%]		Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2			Durchgang 1	Durchgang 2		
	vaskuläre SZ	33,33	12,50	22,92	14,73	33,33	33,33	33,33
TA-Zellen	66,67	50,00	58,33	11,79	50,00	50,00	50,00	0,00
andere SZ	0,00	12,50	6,25	8,84	0,00	0,00	0,00	0,00
veränderte SZN	16,67	12,50	14,58	2,95	16,67	16,67	16,67	0,00
	<i>rtell-1 tert</i> [%]		Mittelwert [%]	SD	<i>rtell-1 tert</i> [%]		Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2			Durchgang 1	Durchgang 2		
	vaskuläre SZ	50,00	62,50	56,25	8,84	57,14	100,00	78,57
TA-Zellen	0,00	87,50	43,75	61,87	85,71	100,00	92,86	10,10
andere SZ	12,50	12,50	12,50	0,00	14,29	57,14	35,71	30,30
veränderte SZN	37,50	25,00	31,25	8,84	85,71	85,71	85,71	0,00

Tabelle 8.18: Relative Anzahl [%] der Wurzeln mit toten Zellen im Wurzelmeristem nach *cis*-Platin-Induktion in der F4- und F5-Generaton von *rtel1-1*, *tert*, *rtel1-1 tert* und des Wildtyps. Die verschiedenen Arten an toten Stammzellen (SZ), die ausgewertet wurden, sind in der Tabelle angegeben.

cis-Platin	F4				F5			
	WT [%]		Mittelwert [%]	SD	WT [%]		Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2			Durchgang 1	Durchgang 2		
vaskuläre SZ	33,33	25,00	29,17	5,89	50,00	42,86	46,43	5,05
TA-Zellen	33,33	25,00	29,17	5,89	33,33	42,86	38,10	6,73
andere SZ	0,00	12,50	6,25	8,84	0,00	14,29	7,14	10,10
veränderte SZN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>tert</i> [%]		Mittelwert [%]	SD	<i>tert</i> [%]		Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2			Durchgang 1	Durchgang 2		
vaskuläre SZ	16,67	14,29	15,48	1,68	28,57	25,00	26,79	2,53
TA-Zellen	16,67	28,57	22,62	8,42	42,86	0,00	21,43	30,30
andere SZ	16,67	28,57	22,62	8,42	14,29	0,00	7,14	10,10
veränderte SZN	0,00	14,29	7,14	10,10	0,00	0,00	0,00	0,00
	<i>rtel1-1</i> [%]		Mittelwert [%]	SD	<i>rtel1-1</i> [%]		Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2			Durchgang 1	Durchgang 2		
vaskuläre SZ	83,33	71,43	77,38	8,42	100,00	71,43	85,71	20,20
TA-Zellen	100,00	71,43	85,71	20,20	85,71	100,00	92,86	10,10
andere SZ	50,00	85,71	67,86	25,25	42,86	14,29	28,57	20,20
veränderte SZN	33,33	14,29	23,81	13,47	0,00	14,29	7,14	10,10
	<i>rtel1-1 tert</i> [%]		Mittelwert [%]	SD	<i>rtel1-1 tert</i> [%]		Mittelwert [%]	SD
	Durchgang 1	Durchgang 2			Durchgang 1	Durchgang 2		
vaskuläre SZ	100,00	100,00	100,00	0,00	100,00	90,00	95,00	7,07
TA-Zellen	100,00	85,71	92,86	10,10	87,50	100,00	93,75	8,84
andere SZ	33,33	42,86	38,10	6,73	12,50	50,00	31,25	26,52
veränderte SZN	0,00	14,29	7,14	10,10	100,00	100,00	100,00	0,00

Tabelle 8.19: Primer zur Genotypisierung. Angegeben sind die Primerkombinationen, welche zum Nachweis des Wildtyps-Allels (WT) beziehungsweise der Mutation (Ins) dienen.

Linie	PCR	Primer	Sequenz (5'-3')	T _m [°C]
<i>rtel1-1</i>	Ins	LBd1 RTEL1-IN5-fw1	TCGGAACCACCATCAAACAG GGGTTACCAAACGATTATAC	56 °C
	WT	RTEL1-IN5-fw1 RTEL1-IN7-rev1	GGGTTACCAAACGATTATAC CGACACAGAATATAAAGAACA	56 °C
IC9C	Ins	LB1 IC9C-fw-lang	GACCATCATACTCATTGCTG GAAGAACCTACCTGGTCTGT	56 °C
	WT	IC9C-fw-lang IC9C-rev	GAAGAACCTACCTGGTCTGT CCAGAAGTAAAAGTGAAGTTC	56 °C
<i>recq4A-4</i>	Ins	LB1 RQL4A-R6a	GACCATCATACTCATTGCTG ATCAGAGCCACTCATTGTTG	55 °C
	WT	RQ4A-R6a RQ4-(-2A)	ATCAGAGCCACTCATTGTTG GTCCTGATCGTGTGGACAG	56 °C
<i>mus81-1</i>	Ins	LB1 MUS?-R2	GACCATCATACTCATTGCTG GCAGCATCAATAAGCTCTTG	56 °C
	WT	MUS81-1 MUS?-R2	AGTGAATCTGATAGTGAGTG GCAGCATCAATAAGCTCTTG	56 °C
<i>fancm-1</i>	Ins	LBd1 MPH1-1	TCGGAACCACCATCAAACAG GGATCTAGGGTTCCAATAG	56 °C
	WT	MPH1-1 MPH1-R1	GGATCTAGGGTTCCAATAG CCTCAATCTGCTGCATCAC	56 °C
<i>tert</i>	Ins	JL-202s TERT-R1	TAATAACGCTGCGGACATCTAC GGACATATCCATCAAGGGC	56 °C
	WT	TERT-1 TERT-R1	GAAGCTGTATTGCACGAAC GGACATATCCATCAAGGGC	56 °C
<i>srs2-2</i>	Ins	LBd1 SRS-R1F	TCGGAACCACCATCAAACAG TGCCACACATGTTACTACAG	56 °C
	WT	SRS-2 SRS-R1F	AGTTGATGAATTTCAAGACAC TGCCACACATGTTACTACAG	56 °C

Tabelle 8.20: Liste der verwendeten Primer für Klonierungen und Expressionsanalysen.

Verwendung	PCR	Primer	Sequenz (5'-3')
Expressions-analyse <i>rtel1-1</i>	5' T-DNA	RTEL1-vor-fw RTEL1-RT-rev-A	GAGGAGGAGGAGGAGGA TGACAGGCATTAGTGAGTG
	über T-DNA	RTEL1-RT-fw-B RTEL1-RT-rev-B	AGTGCCAATTCCTAAAAGG GATTTCTAGTTTGCTTCCAG
	3' T-DNA	RTEL1-RT-Fw-C RTEL1-hin-rev	TGGAAAAATGGGTGTTACAG GACCTTACCGCGACAAAC
Haushaltsgen für <i>real-time</i> PCR		Actin2-FW Actin2-REV	CAGATGCCCAGAAGTCTTG GTGCTGTGATTTCTTTGCTC
Klonierung <i>RTEL1</i>	Amplifikation volle Länge	RTEL1-Prom-fw RTEL1-Term-rev	CTCAGGTAGCGGGTTTATC TAAGATACCGGATGAGCC
	Überhänge für pSBO-2	RTEL1-Prom-InF Rtel1-Term-InF	ACGCGTCCATGGTTAATTAAGGTTAGC GGGTTTATC GGTCCGGACGTCTTAATTAATAAGATACAC GGATGAGCC

Eidesstattliche Erklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Botanischen Institut II - Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der Zeit von Januar 2011 bis Juni 2014 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation 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 in der gültigen Fassung vom 09. Juli 2010 beachtet.

Ort, Datum

Julia Recker