

Charakterisierung der Fanconi Anämie-assoziierten Proteine
MHF1 und FAN1 in der DNA-Reparatur und
homologen Rekombination in *Arabidopsis thaliana*

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

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich
genehmigte
DISSERTATION

von

Diplom Biologin Natalie Herrmann

aus

Nürtingen

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky
Referent: Prof. Dr. Holger Puchta
Korreferent: PD Dr. Dietmar Gradl
Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2014

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Holger Puchta bedanken, 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 ihm sehr dankbar.

PD Dr. Dietmar Gradl danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Bereitschaft, diese Arbeit als Korreferent zu betreuen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Alexander Knoll, der mir während meiner Arbeit mit zahlreichen guten Ratschlägen und vielen fachlichen Diskussionen zur Seite stand und mich immer wieder aufs Neue motivieren konnte. Für die viele Zeit, die er mir entgegenbrachte, bin ich ihm sehr dankbar.

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

Ein besonderer Dank gilt auch Jana Bender, die durch ihre stets hoch engagierte, zuverlässige und freundliche Art eine große Hilfe im Labor war und ohne diese viele der Daten nicht produziert hätten werden können. Auch in schwierigen und anstrengenden Situationen behielt sie immer ein Lächeln auf den Lippen.

Für die Pflege meiner Pflanzen möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Botanischen Gartens, insbesondere bei Frau Wehrle, Herrn Knoch und Herrn Malakovski bedanken.

Meinen ehemaligen und aktuellen Bürokollegen Dipl. Biol. Thorben Bodey, Dipl. Biol. Gabriele Ilg, Dipl. Biol. Tobias Klemm, Dr. Oliver Trapp und Dr. Susan Schröpfer möchte ich für die schöne und oft lustige Zeit im Büro danken, die einen auch nach stressigen Arbeitstagen wieder auf andere Gedanken brachte.

Ein ebenfalls besonderer Dank gilt Dipl. Biol. Jeannette Steinert, die auch außerhalb des Instituts bereits seit vielen Jahren eine treue Freundin ist und die sowohl in fachlicher als auch privater Hinsicht immer für mich da war.

Den Mitarbeitern des Botanischen Instituts II danke ich für das stets angenehme und harmonische Arbeitsklima und für die Tatsache, dass neben den fachlichen Belangen auch viele Freundschaften entstanden sind.

Ein großer Dank gilt auch meinen Eltern und meiner ganzen Familie. Für eure Unterstützung und für das Verständnis für die wenige Zeit in den letzten Jahren bin ich euch sehr dankbar.

Der größte Dank gilt meinem Ehemann Frank, der mich durch alle Höhen und Tiefen der Doktorarbeit begleitete und mich auch in schwierigen Situationen immer wieder aufbaute. Für die Tatsache, dass er immer für mich da war und mir viele Lasten, vor allem zum Ende der Doktorarbeit hin, abgenommen hat, bin ich ihm unendlich dankbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Meiose und meiotische Rekombination	1
1.2	DNA-Schäden und ihre Reparatur	4
1.3	Doppelstrangbruchreparatur	6
1.3.1	Nicht-homologe Endverknüpfung	6
1.3.2	<i>Single-strand-annealing</i>	7
1.3.3	Homologe Rekombination	7
1.4	DNA-Quervernetzungen und ihre Reparatur	10
1.4.1	Fanconi Anämie und der Fanconi Anämie-Signalweg	13
1.4.2	FANCM	17
1.4.3	FANCI	19
1.4.4	MHF1	20
1.4.5	FANCD1	21
1.4.6	Die Reparatur von DNA-Quervernetzungen in Pflanzen	24
1.5	Ziele dieser Arbeit	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	Geräte	27
2.1.2	Chemikalien	29
2.1.3	Medien	30
2.1.4	Genotoxine und Antibiotika	31
2.1.5	Puffer und Lösungen	32
2.1.6	Enzyme	34
2.1.7	Kits	34
2.1.8	Organismen	35
2.1.9	Plasmide	36
2.2	Methoden	36

2.2.1 Lagerung von Saatgut.....	36
2.2.2 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.2.3 Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.2.4 Kreuzungen.....	37
2.2.5 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
2.2.6 Etablierung transgener Linien.....	38
2.2.7 Sensitivitätstest.....	39
2.2.8 Zelltodanalyse in Wurzeln.....	40
2.2.9 Rekombinationstest.....	41
2.2.10 Präparation männlicher Meiozyten.....	42
2.2.11 Schnelle DNA-Isolierung aus <i>A. thaliana</i>	42
2.2.12 PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	43
2.2.13 Agarose-Gelelektrophorese.....	46
2.2.14 Aufreinigung eines PCR-Produkts.....	46
2.2.15 Gelaufreinigung.....	47
2.2.16 Restriktionsverdau von Plasmiden.....	47
2.2.17 In-Fusion Klonierung.....	47
2.2.18 Sequenzierung.....	47
2.2.19 RNA-Extraktion.....	48
2.2.20 cDNA Synthese.....	48
2.2.21 Qualitätskontrolle der cDNA.....	48
2.2.22 Quantitative Real-Time PCR.....	49
2.2.23 Transformation von <i>E. coli</i>	49
2.2.24 Übernachtskultur und Plasmidisolierung.....	49
2.2.25 Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	50
3 Ergebnisse.....	51
3.1 Identifikation von <i>MHF1</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
3.1.1 Charakterisierung zweier Insertionsmutanten von <i>AtMHF1</i>	52
3.1.2 Die Funktion von <i>AtMHF1</i> in der DNA Reparatur.....	54

3.1.3 Die Funktion von AtMHF1 in der somatischen homologen Rekombination.....	61
3.1.4 Die Funktion von AtMHF1 in der Meiose	65
3.2 Identifikation von <i>FAN1</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
3.2.1 Bioinformatische Untersuchungen von AtFAN1	68
3.2.2 Charakterisierung einer Insertionsmutante von <i>AtFAN1</i>	70
3.2.3 Die Funktion von AtFAN1 in der DNA Reparatur	71
3.2.4 Komplementationsanalysen von AtFAN1 mit verschiedenen FAN1 Konstrukten	73
3.2.5 Die Funktion von AtFAN1 bei Replikationsstress im Wurzelmeristem	77
3.2.6 Die Funktion von AtFAN1 in der somatischen homologen Rekombination	79
3.2.7 Einordnung von FAN1 in die Interstrang-CL Reparatur.....	81
4 Diskussion	88
4.1 Identifikation von MHF1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	88
4.1.1 Charakterisierung zweier Insertionsmutanten von <i>AtMHF1</i>	88
4.1.2 Die Funktion von AtMHF1 in der DNA Reparatur.....	89
4.1.3 Die Funktion von AtMHF1 in der somatischen homologen Rekombination.....	96
4.1.4 Die Funktion von AtMHF1 in der Meiose	98
4.2 Identifikation von FAN1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	100
4.2.1 Bioinformatische Untersuchungen von AtFAN1	100
4.2.2 Charakterisierung einer Insertionsmutante von <i>AtFAN1</i>	101
4.2.3 Die Funktion von AtFAN1 in der DNA Reparatur	102
4.2.4 Komplementationsanalysen von AtFAN1 mit verschiedenen FAN1 Konstrukten	102
4.2.5 Die Funktion von AtFAN1 bei Replikationsstress im Wurzelmeristem	105
4.2.6 Die Funktion von AtFAN1 in der somatischen homologen Rekombination	106
4.2.7 Einordnung von FAN1 in die Interstrang-CL Reparatur.....	107
5 Zusammenfassung	111
6 Summary	113
7 Literaturverzeichnis	114
8 Anhang	125

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: <i>Single-strand-annealing</i>	8
Abbildung 1.2: Doppelstrangbruchreparatur durch homologe Rekombination.	11
Abbildung 1.3: Modell der Reparatur von Interstrang-Quervernetzungen.	14
Abbildung 1.4: Fanconi Anämie-Signalweg in Säugern.....	17
Abbildung 1.5: Rekrutierung von FAN1 an DNA-Quervernetzungen.....	22
Abbildung 2.1: Genotypisierung von Insertionsmutanten.....	44
Abbildung 2.2: 5' RACE PCR.	45
Abbildung 3.1: Transkriptionsstartpunkt von <i>AtMHF1</i> , sowie ein Sequenzvergleich der CENP-S Domäne.	52
Abbildung 3.2: Charakterisierung des Insertionsbereich der <i>AtMHF1</i> Mutanten <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i> . 53	
Abbildung 3.3: Bestimmung des Expressionsniveaus von <i>MHF1</i> in <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i>	55
Abbildung 3.4: Relatives Frischgewicht von <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i> gegenüber Mitomycin C (MMC). ..	56
Abbildung 3.5: Relatives Frischgewicht der <i>mhf1-1 recq4A-4</i> Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).	57
Abbildung 3.6: Relatives Frischgewicht der <i>mhf1-1 mus81-1</i> Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).	58
Abbildung 3.7: Relatives Frischgewicht der <i>mhf1-1 rad5A-2</i> Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).	59
Abbildung 3.8: Relatives Frischgewicht der <i>mhf1-1 fancm-1</i> Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).	60
Abbildung 3.9: Relatives Frischgewicht der <i>mhf1-1 fancjb-1</i> Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).	61
Abbildung 3.10: Spontane Rekombinationsrate der <i>mhf1</i> Einzelmutanten <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i>	62
Abbildung 3.11: Spontane Rekombinationsrate der <i>mhf1-1 recq4A-4</i> Doppelmutante.....	63
Abbildung 3.12: Spontane Rekombinationsrate der <i>mhf1-1 mus81-1</i> Doppelmutante.	64
Abbildung 3.13: Spontane Rekombinationsrate der <i>mhf1-1 fancm-1</i> Doppelmutante.....	65
Abbildung 3.14: Präparation von Wildtyp, <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i> Meiozyten.....	67
Abbildung 3.15: Aufbau des FAN1 Proteins in <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
Abbildung 3.16: Maximum Likelihood Baum des ClustalOmega Alignments verschiedener FAN1 Homologe in Pflanzen, Tieren und Pilzen.....	69
Abbildung 3.17: Charakterisierung des Insertionsbereich der <i>AtFAN1</i> Mutante <i>fan1-1</i>	70
Abbildung 3.18: Bestimmung des Expressionsniveaus von <i>FAN1</i> in <i>fan1-1</i>	71
Abbildung 3.19: Relatives Frischgewicht der <i>fan1-1</i> Mutante gegenüber Mitomycin C (MMC).	72

Abbildung 3.20: Aufbau des FAN1 Wildtypkonstrukts.....	74
Abbildung 3.21: Relatives Frischgewicht der <i>fan1-1::FAN1</i> WT Linien gegenüber Mitomycin C (MMC).	74
Abbildung 3.22: Aufbau der FAN1 Konstrukte mit Punktmutation in der Nukleasedomäne.....	75
Abbildung 3.23: Relatives Frischgewicht der <i>fan1-1::FAN1</i> NUC1 und <i>fan1-1::FAN1</i> NUC2 Linien gegenüber Mitomycin C (MMC).	76
Abbildung 3.24: Aufbau des FAN1 Konstrukts mit Deletion der UBZ-Domäne.	77
Abbildung 3.25: Relatives Frischgewicht der <i>fan1-1::FAN1</i> Del UBZ Linien gegenüber Mitomycin C (MMC).	78
Abbildung 3.26: Zelltod im Grundzustand in WT und <i>fan1-1</i> Wurzeln. Die Legende befindet sich auf der folgenden Seite.....	80
Abbildung 3.27: Zelltod in WT und <i>fan1-1</i> Wurzeln nach Behandlung mit 2,5 µg/ml MMC.	82
Abbildung 3.28: Spontane Rekombinationsrate der Einzelmutanten <i>fan1-1</i>	83
Abbildung 3.29: Relatives Frischgewicht der <i>fan1-1 recq4A-4</i> Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).....	84
Abbildung 3.30: Relatives Frischgewicht der <i>fan1-1 mus81-1</i> Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).	85
Abbildung 3.31: Relatives Frischgewicht der <i>fan1-1 rad5A-2</i> Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).	86
Abbildung 3.32: Relatives Frischgewicht der <i>fan1-1 mhfl-1</i> Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).	86
Abbildung 3.33: Relatives Frischgewicht der <i>fan1-1 fancjb-1</i> Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC)..	87
Abbildung 4.1: Modell über die Interstrang-Crosslink (CL) Reparaturwege mit Einordnung von MHF1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	95
Abbildung 4.2: Modell über die in die somatische homologe Rekombination (HR) involvierten Reparaturwege mit Einordnung von MHF1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	98
Abbildung 4.3: Modell über die Interstrang-Crosslink (CL) Reparaturwege mit Einordnung von FAN1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	110
Abbildung 8.1: Sensitivität von <i>mhfl-1</i> und <i>mhfl-2</i> gegenüber Bleomycin.	129
Abbildung 8.2: Sensitivität von <i>mhfl-1</i> und <i>mhfl-2</i> gegenüber <i>cis</i> -Platin.....	130
Abbildung 8.3: Sensitivität von <i>mhfl-1</i> und <i>mhfl-2</i> gegenüber Methylmethansulfonat.....	132
Abbildung 8.4: Sensitivität von <i>mhfl-1</i> und <i>mhfl-2</i> gegenüber Hydroxyurea.....	133
Abbildung 8.5: Sensitivität von <i>mhfl-1</i> und <i>mhfl-2</i> gegenüber Camptothecin.	134
Abbildung 8.6: Sensitivität von <i>fan1-1</i> gegenüber Bleomycin.	143
Abbildung 8.7: Sensitivität von <i>fan1-1</i> gegenüber <i>cis</i> -Platin.....	144
Abbildung 8.8: Sensitivität von <i>fan1-1</i> gegenüber Methylmethansulfonat.....	146

Abbildung 8.9: Sensitivität von <i>fan1-1</i> gegenüber Hydroxyurea.....	147
Abbildung 8.10: Sensitivität von <i>fan1-1</i> gegenüber Camptothecin.	148
Abbildung 8.11: Relative Expression von <i>FAN1</i> in den <i>fan1-1::FAN1</i> WT Linien.	151
Abbildung 8.12: Relative Expression von <i>FAN1</i> in den <i>fan1-1::FAN1</i> NUC1 Linien.	154
Abbildung 8.13: Relative Expression von <i>FAN1</i> in den <i>fan1-1::FAN1</i> NUC2 Linien.	156
Abbildung 8.14: Relative Expression von <i>FAN1</i> in den <i>fan1-1::FAN1</i> Del UBZ Linien.....	159

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Antibiotika.....	32
Tabelle 2.2: Verwendete Insertionslinien.....	35
Tabelle 2.3: Genotoxinzugabe bei Sensitivitätstests.....	40
Tabelle 8.1: Verwendete Primer zur Genotypisierung.....	125
Tabelle 8.2: Verwendete Primerkombinationen und PCR-Bedingungen zur Genotypisierung.....	126
Tabelle 8.3: Verwendete Primer für Expressionsanalysen und zur Klonierung der FAN1 Konstrukte.	126
Tabelle 8.4: Verwendete Primer für die 5' RACE PCR.....	128
Tabelle 8.5: Relative Expression von <i>AtMHF1</i>	128
Tabelle 8.6: Sensitivität von <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i> gegenüber Bleomycin.....	128
Tabelle 8.7: Sensitivität von <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i> gegenüber <i>cis</i> -Platin.....	129
Tabelle 8.8: Sensitivität von <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i> gegenüber Mitomycin C.....	131
Tabelle 8.9: Sensitivität von <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i> gegenüber Methylmethansulfonat.....	131
Tabelle 8.10: Sensitivität von <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i> gegenüber Hydroxyurea.....	132
Tabelle 8.11: Sensitivität von <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i> gegenüber Camptothecin.....	133
Tabelle 8.12: Sensitivität der Doppelmutante <i>mhf1-1 recq4A-4</i> gegenüber Mitomycin C.....	134
Tabelle 8.13: Sensitivität der Doppelmutante <i>mhf1-1 mus81-1</i> gegenüber Mitomycin C.....	135
Tabelle 8.14: Sensitivität der Doppelmutante <i>mhf1-1 rad5A-2</i> gegenüber Mitomycin C.....	136
Tabelle 8.15: Sensitivität der Doppelmutante <i>mhf1-1 fancm-1</i> gegenüber Mitomycin C.....	136
Tabelle 8.16: Sensitivität der Doppelmutante <i>mhf1-1 fancjb-1</i> gegenüber Mitomycin C.....	137
Tabelle 8.17: Relative Rekombinationsrate von <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i>	138
Tabelle 8.18: Relative Rekombinationsrate der <i>mhf1-1 recq4A-4</i> Doppelmutante.....	139
Tabelle 8.19: Relative Rekombinationsrate der <i>mhf1-1 mus81-1</i> Doppelmutante.....	140
Tabelle 8.20: Relative Rekombinationsrate der <i>mhf1-1 fancm-1</i> Doppelmutante.....	141
Tabelle 8.21: Anzahl der Samen und Länge pro Schote von <i>mhf1-1</i> , <i>mhf1-2</i> und dem Wildtyp.....	142
Tabelle 8.22: Relative Expression von <i>AtFAN1</i>	142
Tabelle 8.23: Sensitivität von <i>fan1-1</i> gegenüber Bleomycin.....	143
Tabelle 8.24: Sensitivität von <i>fan1-1</i> Mutante gegenüber <i>cis</i> -Platin.....	144
Tabelle 8.25: Sensitivität von <i>fan1-1</i> gegenüber Mitomycin C.....	145
Tabelle 8.26: Sensitivität von <i>fan1-1</i> gegenüber Methylmethansulfonat.....	145
Tabelle 8.27: Sensitivität von <i>fan1-1</i> gegenüber Hydroxyurea.....	146
Tabelle 8.28: Sensitivität von <i>fan1-1</i> gegenüber Camptothecin.....	147
Tabelle 8.29: Sensitivität der <i>fan1-1::FAN1</i> WT Linien.....	148
Tabelle 8.30: Relative Expression von <i>FAN1</i> in den <i>fan1-1::FAN1</i> WT Linien.....	149
Tabelle 8.31: Sensitivität der <i>fan1-1::FAN1</i> NUC1 Linien.....	151

Tabelle 8.32: Relative Expression von <i>FAN1-1</i> in den <i>fan1-1::FAN1</i> NUC1 Linien.....	152
Tabelle 8.33: Sensitivität der <i>fan1-1::NUC2</i> Linien.	154
Tabelle 8.34: Relative Expression von <i>FAN1</i> in den <i>fan1-1::FAN1</i> NUC2 Linien.	155
Tabelle 8.35: Sensitivität der <i>fan1-1::FAN1</i> Del UBZ Linien.	157
Tabelle 8.36: Relative Expression von <i>FAN1</i> in den <i>fan1-1::FAN1</i> Del UBZ Linien.....	158
Tabelle 8.37: Relativer Anteil [%] Wurzeln im Grundzustand.	159
Tabelle 8.38: Relativer Anteil [%] Wurzeln nach MMC-Behandlung.....	160
Tabelle 8.39: Relative Rekombinationsrate von <i>fan1-1</i>	160
Tabelle 8.40: Sensitivität der <i>fan1-1 recq4A-4</i> Doppelmutante.	161
Tabelle 8.41: Sensitivität der <i>fan1-1 mus81-1</i> Doppelmutante.	162
Tabelle 8.42: Sensitivität der <i>fan1-1 rad5A-2</i> Doppelmutante.....	163
Tabelle 8.43: Sensitivität von der <i>fan1-1 mhf1-1</i> Doppelmutante.....	164
Tabelle 8.44: Sensitivität der <i>fan1-1 fancjb-1</i> Doppelmutante.....	165

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure, <i>amino acid</i>
APC/C-Komplex	<i>Anaphase-promoting complex/cyclosome</i>
AP-Stelle	Apurin-/Apyrimidin-Stelle
BER	Basenexzisionsreparatur
Bleo	Bleomycin
bp	Basenpaar, <i>base pair</i>
CL	Quervernetzung, <i>Crosslink</i>
CO	<i>Crossover</i>
CPT	Camptothecin
D-loop	<i>displacement loop</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dHJ	doppelte Holliday Junction
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur, <i>double-strand break repair</i>
FA	Fanconi Anämie
HR	homologe Rekombination
HU	Hydroxyurea, Hydroxyharnstoff
LB	<i>left border</i>
MMC	Mitomycin C
MMEJ	<i>microhomology-mediated end-joining</i>
MMR	Mismatchreparatur
MMS	Methylmethansulfonat
NCO	<i>Noncrossover</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur

NHEJ	nicht-homologe Endverknüpfung, <i>non-homologous end-joining</i>
NLS	Nukleuserkennungssequenz, <i>nucleus localization sequence</i>
PRR	Postreplikative Reparatur
RB	<i>right border</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
SSA	<i>single-strand-annealing</i>
SDSA	<i>synthesis-dependent strand-annealing</i>
SF2	Superfamilie 2
TLS	Translasionssynthese

1 Einleitung

Die DNA ist ein in allen Lebewesen vorkommendes Biomolekül und als Träger der Erbinformation von zentraler Bedeutung. 1953 gelang es dem Physiker Francis Crick und seinem Kollegen, dem Biologen James Watson, den strukturellen Aufbau der DNA aufzuklären (Watson und Crick, 1953). Dabei stellten sie fest, dass die DNA in Form einer Doppelhelix vorliegt und die beiden Stränge durch Basenpaarungen aus Pyrimidin- und Purinbasen zusammengehalten werden. Weiterhin fanden sie heraus, dass die Paarung von Pyrimidin- und Purinbasen nicht willkürlich, sondern nur zwischen Adenin und Thymin oder Guanin und Cytosin stattfinden kann. Seit dieser bedeutenden Entdeckung hat das Interesse an der Erforschung der DNA und dem Zusammenspiel zwischen DNA, Proteinen und zellulären Prozessen bis heute nicht abgenommen. Um diese Themen weiter zu erforschen werden verschiedene Modellorganismen verwendet. Einer dieser Modellorganismen stellt die Ackerschmalwand, *Arabidopsis thaliana*, dar. *A. thaliana* zählt zu der Familie der Brassicaceae und besitzt einige, für die Verwendung als Modellorganismus, positive Eigenschaften wie eine relativ kurze Generationszeit von vier bis sechs Wochen, eine geringe Größe und eine hohe Anzahl an Nachkommen. Das Genom von *Arabidopsis* ist seit dem Jahr 2000 vollständig sequenziert, wodurch sich viele Sequenzen bestimmten Genen und damit auch Funktionen innerhalb der Zelle zuweisen lassen (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Da zahlreiche Gene und ihre Funktionen über die Verwandtschaft von Organismen hinaus konserviert vorliegen, lassen sich viele, in *Arabidopsis* gewonnene Erkenntnisse, auch auf medizinische Fragestellungen übertragen. Weiterhin weist die Modellpflanze *A. thaliana* im Vergleich zu tierischen Modellorganismen noch eine weitere positive Eigenschaft auf: Sie ist toleranter gegenüber Mutationen von Genen, die in die DNA-Reparatur involviert sind. Die Mutation wichtiger Reparaturgene führt in Säugern häufig zur Embryoletalität, wohingegen vergleichbare Mutationen in *Arabidopsis* nur selten das Absterben der Pflanze verursachen, was eine Untersuchung der Gene erleichtert. Aufgrund der Ähnlichkeit der Mechanismen werden nicht nur DNA-Reparaturgene untersucht. Auch die Meiose, zur Rekombination maternaler und paternaler Chromosomenteile in der sexuellen Fortpflanzung ist Gegenstand heutiger Analysen.

1.1 Meiose und meiotische Rekombination

Die Meiose ist ein essentieller zellulärer Prozess zur Verteilung des Erbguts bei der Entstehung neuer Individuen. Durch zwei aufeinanderfolgende Reduktionsteilungen entstehen aus einer diploiden Vorläuferzelle vier haploide, genetisch unterschiedliche Gameten. Diese genetische Variabilität ist für die Diversität der Nachkommen und für die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen unerlässlich.

Innerhalb der Meiose sind hierfür zwei Vorgänge entscheidend. Zum einen werden in der Meiose gezielt Doppelstrangbrüche induziert, um den Austausch genetischen Materials zwischen väterlichen und mütterlichen Chromosomen zu fördern. Zum anderen findet die Verteilung der Chromatiden am Ende der Meiose zufällig statt. In *Arabidopsis thaliana* findet die weibliche und männliche Gametogenese getrennt voneinander in zwei unterschiedlichen Organen statt (Boavida *et al.*, 2005).

Die weibliche Gametogenese spielt sich innerhalb des Fruchtknotens ab. Die weibliche Vorläuferzelle, auch Megasporenmutterzelle genannt, durchläuft zuerst zwei Reduktionsteilungen, wodurch sich vier haploide Kerne bilden. Drei dieser haploiden Kerne degenerieren, wohingegen der vierte Kern die Megaspore bildet. Nach drei mitotischen Teilungen der Megaspore bildet sie den Embryosack mit acht Kernen, aufgeteilt in jeweils vier Kerne an jedem Pol. Diese acht Kerne bilden schließlich insgesamt sieben Zellen aus: Die Eizelle, drei Antipodenzellen an einem Pol und eine doppelkernige Polzelle im Zentrum, sowie zwei Synergidzellen am anderen Pol (Smyth *et al.*, 1990; Schneitz *et al.*, 1997).

Die männliche Gametogenese von *Arabidopsis* findet in den vier Pollensäcken der Antheren statt. Innerhalb dieser vier Pollensäcke befinden sich Mikrosporenmutterzellen, von denen jede zwei meiotische Teilungen durchläuft. Aus diesen Teilungen gehen pro Mikrosporenmutterzelle vier Mikrosporen hervor. Die Mikrosporen teilen sich anschließend asymmetrisch, wodurch eine große vegetative und eine kleine generative Zelle entstehen. Die kleine generative Zelle teilt sich und bildet so zwei Spermazellen aus, die die doppelte Befruchtung im Embryosack durchführen (Ma, 2005).

Der Ablauf der meiotischen Teilungen läuft sowohl bei der weiblichen, als auch der männlichen Gametogenese gleich ab. Bis zur G₂-Phase folgt die Meiose dem normalen Zellzyklus. Anschließend folgen zwei Reduktionsteilungen. Die Meiose I beginnt mit einer Prophase, die sich in verschiedene Phasen unterteilen lässt: Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese. Während der ersten Phase, dem Leptotän, findet die Kondensation der Chromosomen statt. Im anschließenden Zygotän beginnen sich die homologen Chromosomen zu paaren, wodurch sich der sogenannte synaptonemale Komplex ausbildet, der die Chromosomen zusammenhält (Page und Hawley, 2004). Innerhalb des Pachytäns kommt es zum Austausch des genetischen Materials zwischen den väterlichen und mütterlichen homologen Chromosomen. Wie bereits weiter oben beschrieben, ist dieser Austausch, der auch als *Crossover* (CO) bezeichnet wird, unerlässlich für eine genetische Variabilität. An das Pachytän schließt sich die Diplotänphase an, in der sich die homologen Chromosomen wieder voneinander trennen. Diejenigen Stellen jedoch, an denen ein CO stattgefunden hat, sind in Form von cytologischen Strukturen, den sogenannten Chiasmata, weiterhin sichtbar. Innerhalb der letzten Phase der Prophase I, der Diakinese, findet die maximale Kondensation der Chromosomen statt und die Kernhülle beginnt sich aufzulösen. Der Prophase I folgt die Metaphase I, in der sich die Chromosomen in der Äquatorialebene einfinden. In der Anaphase I werden die homologen Chromosomen voneinander separiert, indem sie jeweils zu den gegenüberliegenden Spindelpolen gezogen werden. Auch die

Meiose II beinhaltet eine Prophase, Metaphase und eine Anaphase, allerdings werden hierbei die Schwesterchromatiden voneinander separiert. Die letzten Phasen der Meiose I und II werden als Telophase I beziehungsweise II bezeichnet, in der dann jeweils ein Chromosom (Telophase I), beziehungsweise ein Chromatid (Telophase II) pro Zelle vorliegen.

Wie bereits erwähnt, findet während der Meiose das *Crossover* statt, was zum Austausch genetischen Materials führt. Hierfür werden durch das Protein SPO11 Doppelstrangbrüche (DSB) in die DNA induziert (Bergerat *et al.*, 1997; Keeney *et al.*, 1997; Hartung und Puchta, 2000; Grelon *et al.*, 2001). Durch Endresektion werden einzelsträngige 3'-Überhänge gebildet, an die sich Einzelstrangbindepoteine anlagern. Diese Einzelstrangbindepoteine sind RAD51 und DMC1, die die Invasion in den intakten homologen Doppelstrang katalysieren (Klimyuk und Jones, 1997; Li *et al.*, 2004; Shinohara und Shinohara, 2004; Seeliger *et al.*, 2012). Der invadierte Einzelstrang wird ausgehend von der Sequenzinformation des intakten Doppelstrangs verlängert, wodurch sich ein sogenannter *displacement loop* (D-loop) ausbildet. Der induzierte DSB kann entweder in CO oder *Noncrossover* (NCO) Produkten resultieren. Im Hinblick auf die Entstehung von NCO Produkten wird der D-loop aus dem intakten Doppelstrang verdrängt. Allerdings wurde der invadierte Einzelstrang bereits so weit verlängert, dass er mit dem anderen Ende des DSB Basenpaarungen eingehen kann. Für die Bildung von CO Produkten wird der D-loop weiter verlängert, bis dieser mit dem zweiten resektierten Doppelstrangbruchende Basenpaarungen eingehen kann. Hierdurch bildet sich eine sogenannte doppelte *Holliday Junction* (dHJ) aus, in der beide Stränge topologisch miteinander verknüpft sind (Szostak *et al.*, 1983). Studien in Hefe ergaben mindestens zwei Signalwege um CO Produkte zu generieren (de los Santos *et al.*, 2003; Hollingsworth und Brill, 2004). Diese CO Produkte können allgemein in zwei Klassen eingeteilt werden, die als Klasse I und Klasse II CO bezeichnet werden. Klasse I CO entstehen unter Anderem in Zusammenarbeit von MSH4 und MSH5, den Homologen des bakteriellen MutS (Ross-Macdonald und Roeder, 1994). Diese Klasse an CO wird als Interferenz-sensitiv bezeichnet, was beschreibt, dass die Ausbildung eines CO die Entstehung eines zweiten CO in angrenzenden Bereichen inhibiert (Jones, 1984). Klasse II CO zeigen keine Interferenz bezüglich der Entstehung eines neuen CO und werden unter anderem durch MUS81/MMS4 generiert (de los Santos *et al.*, 2003; Hollingsworth und Brill, 2004). Das Verhältnis von Interferenz-sensitiven zu Interferenz-unabhängigen CO Produkten ist von Organismus zu Organismus verschieden. So sind in Pflanzen etwa 15 % aller CO Interferenz-unabhängig (de los Santos *et al.*, 2003; Börner *et al.*, 2004; Higgins *et al.*, 2004), wohingegen in Hefe fast alle CO über diesen Weg gebildet werden (Smith *et al.*, 2003). In *Caenorabditis elegans* scheinen ausschließlich Interferenz-sensitive CO Produkte zu entstehen (Zalevsky *et al.*, 1999).

1.2 DNA-Schäden und ihre Reparatur

Alle lebenden Organismen sind ständig schädigenden Faktoren ausgesetzt, die zu verschiedenen DNA-Schäden führen können. Man unterscheidet dabei zwischen exogenen Faktoren, die von außen auf den Organismus einwirken, und endogenen Faktoren, die innerhalb der Zelle agieren. Zu den exogenen DNA-schädigenden Faktoren zählen unter anderem UV-Strahlung und Genotoxine. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und freie Radikale werden zu den endogenen Faktoren gezählt. Ebenso vielfältig wie die Anzahl an verschiedenen DNA-Schäden ist die Vielzahl an DNA-Reparaturmechanismen zur Beseitigung dieser Schäden, um die Integrität des Genoms zu gewährleisten.

Die Basenexzisionsreparatur (BER) entfernt chemische Modifikationen, die durch Alkylierung, Desaminierung und Depurinierung/Depyrimidierung entstehen und dabei aber keine Verzerrungen der DNA-Struktur auslösen. Erkannt werden diese Modifikationen durch DNA-Glycosylasen, die die veränderten Basen aus dem Nukleotid ausschneiden. Dadurch entsteht eine Apurin- beziehungsweise Apyrimidinstelle (AP-Stelle), in die gegenüber theoretisch jede beliebige Base eingebaut werden kann. Um dies zu verhindern, schneidet eine AP-Endonuklease das verbliebene Zucker-Phosphat-Rückgrat. Anschließend existieren zwei verschiedene Möglichkeiten, wie der DNA-Schaden repariert werden kann. Anstelle des beschädigten Nukleotids wird entweder nur ein korrektes Nukleotid eingefügt (*short-patch* BER) oder es kommt zu einer Verdrängung des geschädigten Strangs um ein paar Nukleotide durch eine DNA-Polymerase (*long-patch* BER). Dieses verdrängte DNA-Molekül wird anschließend durch eine Endonuklease abgebaut und die entstandene Lücke wieder aufgefüllt. In beiden Fällen aber wird das DNA-Rückgrat durch Ligation geschlossen (Übersicht in Robertson *et al.*, 2009).

DNA-Schäden, die zu Verzerrungen der Struktur der DNA-Doppelhelix führen, werden durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) entfernt. Solche Schäden werden unter anderem durch UV-Strahlung erzeugt, die zu Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren und (6-4)-Photoprodukten führen können. Die NER-Maschinerie erkennt dabei die DNA-Verzerrung und rekrutiert Endonukleasen, die beidseitig des Schadens schneiden und ein kurzes Oligonukleotid herauslösen. Durch DNA-Polymerasen wird der fehlende Bereich aufgefüllt und das DNA-Rückgrat durch Ligation geschlossen. Im Hinblick auf die unterschiedliche Schadenserkenkung lässt sich die NER in zwei Wege unterteilen. In der Genom-übergreifenden NER (*global-genome* NER) werden die Schäden unabhängig von der Transkription im Genom erkannt und repariert, wohingegen die Transkriptions-gekoppelte NER (*transcription-coupled* NER) Schäden entfernt, die zu einer Blockade der Transkription führen (Übersicht in Kamileri *et al.*, 2012).

In Pflanzen, Bakterien und Pilzen existiert noch ein weiterer Reparaturmechanismus zur Entfernung von UV-induzierten Schäden, der auch als Photoreaktivierung bekannt ist. Dieser Mechanismus verwendet hierfür das Enzym Photolyase, welches spezifisch an den DNA-Schaden bindet und Blaulicht absorbiert.

Durch die Energie des Lichts werden die kovalenten Verknüpfungen zwischen den Basendimeren aufgelöst, wodurch der Schaden repariert werden kann (Übersicht in Essen und Klar, 2006).

Die Mismatch-Reparatur (MMR) übernimmt die Korrektur von Basenfehlpaarungen, die während der DNA-Replikation eingebaut wurden. In Prokaryoten wird der Schaden durch das Protein MutS erkannt, welches mit MutL interagiert. MutL wiederum aktiviert die Endonuklease MutH, die ein Stück der DNA im Bereich der Fehlpaarung schneidet. Mit Hilfe einer Helikase wird der DNA-Strang bis zum Schaden hin entwunden, woraufhin eine Exonuklease das fehlerhafte Stück entfernt. Die entstandene Lücke wird anschließend durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt und das DNA-Rückgrat durch Ligation geschlossen. In Eukaryoten wird die MMR durch die strukturell verwandten Proteine MSH (MutS Homolog) und MLH (MutL Homolog) ausgeführt (Übersicht in Fukui, 2010).

DNA-Schäden, die über den Eintritt in die S-Phase bestehen bleiben, führen häufig zur Blockierung der Replikationsgabel, da die replikative Polymerase über DNA-Schäden nicht hinweg synthetisieren kann. Um die Replikation wieder aufzunehmen und um damit die genomische Integrität zu gewährleisten, existieren zwei verschiedene Schadenstoleranzwege innerhalb der Zelle. Während der Transläsionssynthese (TLS) wird die replikative Polymerase durch Transläsionspolymerasen ausgetauscht, die über den Schaden hinweg synthetisieren können. Dadurch wird sichergestellt, dass die DNA-Replikation fortgesetzt werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass Transläsionspolymerasen eine höhere Fehleranfälligkeit besitzen, kann die TLS, in Abhängigkeit der Schadensart und der eingesetzten Transläsionspolymerase, entweder fehlerfrei aber auch fehlerbehaftet ablaufen (Prakash *et al.*, 2005b). Den zweiten Schadenstoleranzweg stellt die postreplikative Reparatur (PRR) dar. Innerhalb dieser Reparatur wird der neue, unbeschädigte Tochterstrang ein kurzes Stück über die Schadstelle hinaus repliziert (*overshoot* Synthese). Durch Regression der Replikationsgabel (*fork regression*) sind die beiden neu synthetisierten Tochterstränge in der Lage, miteinander Basenpaarungen einzugehen, wodurch eine sogenannte *chicken-foot* Struktur ausgebildet wird. Der längere der beiden Tochterstränge dient nun als Matrize zur Synthese des kürzeren Strangs. Die *chicken-foot* Struktur kann entweder durch Umkehrung der Replikationsgabel aufgelöst werden oder als Ausgangspunkt für die Reparatur über homologe Rekombination (HR) dienen (vgl. Abschnitt 1.3.3). In beiden Fällen wird die Schadstelle überwunden und die Replikation kann weiter fortgeführt werden. Die HR dient neben der Beteiligung an der PRR auch als Möglichkeit, in der Zelle entstandene DSBs zu reparieren. Doppelstrangbrüche stellen die schwerwiegendste Schadensart innerhalb der Zelle dar, denn sie können im nicht reparierten Zustand den Tod der Zelle auslösen.

1.3 Doppelstrangbruchreparatur

Doppelstrangbrüche in der DNA können sowohl durch exogene, als auch endogene Faktoren, wie etwa ionisierende Strahlung, freie Radikale, Genotoxine oder durch zelleigene Proteine verursacht werden. Durch die Tatsache, dass bei DSBs das Phosphatrückgrat zweier komplementärer DNA-Einzelstränge gebrochen ist, kann die Sequenzinformation des komplementären Strangs zur Reparatur nicht herangezogen werden, was eine besondere Herausforderung für die Zelle darstellt. Innerhalb der Zelle existieren Reparaturmechanismen, die eine schnelle Reparatur durch Ligation der freien Bruchenden ermöglichen, was die genomische Integrität bewahrt. Allerdings geht diese Art von Reparatur häufig mit Insertionen und Deletionen einher. Innerhalb der Zelle existiert noch ein weiterer Reparaturprozess, der zum Erhalt der Sequenzinformation führt, indem bei der Reparatur auf homologe Bereiche zurückgegriffen wird, was als homologe Rekombination bezeichnet wird.

1.3.1 Nicht-homologe Endverknüpfung

Die Nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ) stellt in komplexen Eukaryoten den Hauptreparaturmechanismus zur Beseitigung von DSBs dar. Dieser evolutionär hoch konservierte Mechanismus beruht auf der Ligation der freien Bruchenden, was meist mit Deletionen oder Insertionen von fremden Sequenzen verbunden ist (Salomon und Puchta, 1998; Kirik *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Fehleranfälligkeit kann NHEJ zur Genomevolution beitragen (Kirik *et al.*, 2000; Orel *et al.*, 2003). Zu Beginn der NHEJ in Säugern werden die freien Bruchenden von dem Heterodimer KU70/KU80 gebunden, was den Abbau der 5'-Enden verhindert und die Bruchenden in unmittelbarer Nähe zueinander hält. Gleichzeitig dient der KU70/KU80 Komplex als Plattform für die Anlagerung weiterer Reparaturproteine. Auf diese Weise wird die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase DNA-PKcs rekrutiert, die wiederum durch Phosphorylierung weitere NHEJ-Proteine aktiviert und an den Schaden führt. Die Exonuklease ARTEMIS prozessiert nicht ligierbare Enden, die anschließend durch die Ligase IV und XRCC4 wieder miteinander verknüpft werden können (Hefferin und Tomkinson, 2005). Pflanzen besitzen keine DNA-PKcs und auch keine ARTEMIS Exonuklease. Nach Bindung des KU70/KU80 Komplex wird der MRN-Komplex rekrutiert, der sich aus den Proteinen MRE11, RAD50, und NBS1 zusammensetzt (Bleuyard *et al.*, 2006) und die Enden in räumlicher Nähe hält. Durch die Endo- und Exonukleaseaktivität von MRE11 werden die Enden prozessiert und anschließend durch das DNA-Ligase IV/XRCC4 Homolog DNL4/LIF1 ligiert (Zhang *et al.*, 2007).

Neben diesem NHEJ-Mechanismus existiert noch mindestens ein alternativer, KU70/KU80 unabhängiger NHEJ-Weg, der als *microhomology-mediated end-joining* (MMEJ) bezeichnet wird (McVey und Lee, 2008). Hierbei kommt es zur Hybridisierung der freien Bruchenden durch kleine, einzelsträngige Homologiebereiche. Im Gegensatz zum NHEJ werden beim MMEJ freie 3'-Überhänge

benötigt, die durch Resektion des 5'-Endes generiert werden (Lee und Lee, 2007). Überstehende, nicht homologe Bereiche werden vor der folgenden Ligation entfernt (Ma *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2008).

1.3.2 *Single-strand-annealing*

Kommen auf beiden Seiten des DSB Sequenzwiederholungen vor, kann dieser durch den *single-strand-annealing*-Weg (SSA) repariert werden (Lin *et al.*, 1984), der in Abbildung 1.1 dargestellt ist. Der Vorgang des SSA ist prinzipiell dem Prozess des MMEJ sehr ähnlich, allerdings unterscheiden sich beide Reparaturmechanismen im Hinblick auf die beteiligten Proteine und die Länge des benötigten homologen Sequenzbereichs. In Hefe wird die Resektion der freien Bruchenden durch die Exonuklease 1 (ScExo1) oder durch die Endonuklease ScDna2 zusammen mit der RecQ-Helikase ScSgs1 durchgeführt (Bae *et al.*, 1998; Mimitou und Symington, 2008; Zhu *et al.*, 2008). Die 3'-Überhänge werden anschließend vom Einzelstrangbindeprotein RPA (*replication protein A*) gebunden, bevor RAD52 die Hybridisierung der homologen Bereiche ermöglicht. Nicht homologe Überhänge werden durch Nukleasen entfernt und vorhandene Lücken durch Synthese aufgefüllt. Schließlich wird das DNA-Rückgrat durch Ligation geschlossen. Im Gegensatz zum NHEJ und MMEJ, bei denen eine Reparatur ohne Sequenzverlust unter bestimmten Umständen möglich ist, gehen beim SSA immer alle Bereiche, die sich zwischen den Sequenzwiederholungen befinden, verloren (Siebert und Puchta, 2002). Ein Mechanismus zur fehlerfreien Reparatur von DSBs stellt die homologe Rekombination dar.

1.3.3 Homologe Rekombination

Die homologe Rekombination (HR) ist ein essentieller Mechanismus innerhalb der Zelle, der nicht nur die Neukombination der genetischen Information während der Meiose (vgl. Abschnitt 1.1), sondern auch die genomische Stabilität gewährleistet. In somatischen Zellen ist die HR sowohl für die Reparatur von DSBs als auch für die Wiederaufnahme der Replikation an blockierten Replikationsgabeln zuständig. Im Gegensatz zu den NHEJ-, MMEJ- und SSA-Wegen wird die Reparatur von DSBs durch HR fehlerfrei vollzogen, da homologe Sequenzbereiche als Matrize verwendet werden. Diese Bereiche können von unterschiedlichen Positionen im Genom stammen (Inbar *et al.*, 2000).

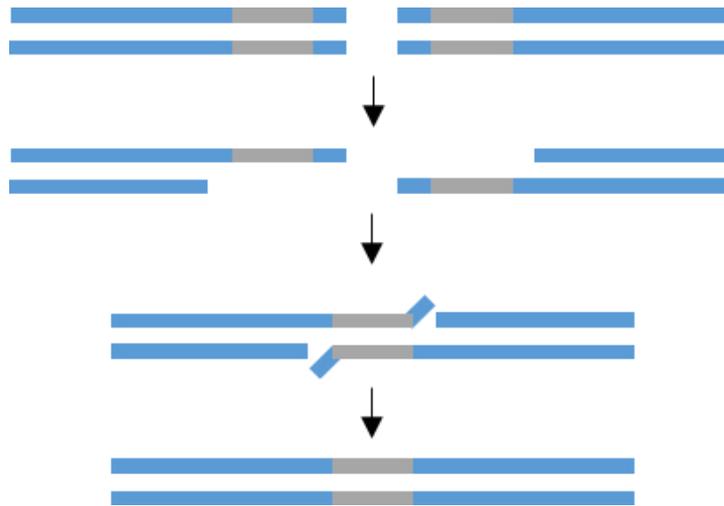


Abbildung 1.1: Single-strand-annealing.

Das *single-strand-annealing* (SSA) stellt einen Reparaturmechanismus zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSBs) dar, wenn auf beiden Seiten des Bruchs homologe Sequenzwiederholungen vorhanden sind. Nach Entstehung von DSBs werden die freien Bruchenden in 5'-3' Richtung zurückgeschnitten, wodurch freie 3'-Überhänge gebildet werden. Aufgrund der Sequenzwiederholungen, die sich beidseitig des Bruchs befinden, sind die homologen Bereiche in der Lage miteinander zu hybridisieren. Die überstehenden, nicht homologen Bereiche werden anschließend durch eine Nuklease entfernt. Durch Ligation wird das DNA Rückgrat wieder geschlossen. Der DSB wurde repariert. Da jedoch diejenigen Bereiche, die sich zuvor zwischen den homologen Sequenzwiederholungen befanden, entfernt werden, geht dieser Reparaturmechanismus immer mit Deletionen einher.

Eine Möglichkeit für homologe Sequenzbereiche stellt das Schwesterchromatid dar, welches sich während der späten S-Phase und G2-Phase des Zellzyklus in unmittelbarer Nähe befindet (Kadyk und Hartwell, 1992; Dronkert *et al.*, 2000; Gonzalez-Barrera *et al.*, 2003). Neben dem Schwesterchromatid können auch das homologe Chromosom (Gisler *et al.*, 2002), intrachromosomal vorliegende homologe Bereiche, als auch ektopische Sequenzen als Matrize verwendet werden (Shalev und Levy, 1997; Inbar und Kupiec, 1999; Puchta, 1999; Aylon und Kupiec, 2003; Puchta, 2005). Die Reparatur von DSBs mittels HR lässt sich in verschiedene Schritte unterteilen: Resektion der Bruchenden, Invasion des Einzelstrangs in den intakten homologen Doppelstrang, DNA-Synthese und Prozessierung der DNA-Intermediate. Der Ablauf der HR kann durch die Kombination verschiedener Modelle erklärt werden.

Der Beginn der HR läuft in allen Modellen gleich ab. Nach Auftreten eines DSB erfolgt eine 5'-3'-Resektion der freien Bruchenden durch den MRN-Komplex in Säugern (MRE11, RAD50, NBS1), welcher sich in Arabidopsis aus den Proteinen AtMRE11 (Puizina *et al.*, 2004), AtRAD50 (Bleuyard *et al.*, 2004) und AtNBS1 (Waterworth *et al.*, 2007) zusammensetzt. In Hefe wird dieser auch als MRX-Komplex bezeichnet, da anstelle von NBS1 das Homolog XRS2 Bestandteil des Komplexes ist. Diese Resektion führt zunächst zu einzelsträngigen 3'-Überhängen, die aber nur wenige hundert Basenpaare lang sind. Allerdings reicht diese Länge an einzelsträngigen Bereichen nicht für die HR aus, weshalb durch eine 5'-3'-Exonuklease (EXO1) ein längerer Überhang von einigen tausend Basenpaaren

generiert wird. Diese 3'-Überhänge werden anschließend von der Rekombinase RAD51 gebunden. ATP-gebundenes RAD51 bindet dabei in einer polymerisierten Form an einzelsträngige DNA-Moleküle, so dass ein langes RAD51/DNA-Filament gebildet wird. Dieses Filament wiederum ist in der Lage in doppelsträngiger DNA nach homologen Sequenzen zu suchen und mit diesen Basenpaarungen einzugehen, was als Einzelstrang-Invasion bezeichnet wird. Der zweite Strang des homologen Doppelstrangs wird durch diese Invasion verdrängt, was zur Ausbildung eines D-loops führt. An dieser Stelle gibt es mehrere verschiedene Möglichkeiten mit der Reparatur fortzufahren.

Nach dem *double-strand break repair*-Modell (DSBR-Modell, Szostak *et al.*, 1983) wird der D-loop verlängert, bis der zuvor verdrängte Strang Basenpaarungen mit dem freien 3'-Ende des Doppelstrangbruchs eingehen kann. Dadurch kommt es zur Ausbildung von zwei X-förmigen Strukturen, die als doppelte *Holliday Junction* (dHJ) bezeichnet werden. Anschließend werden die Bruchenden durch Ligation geschlossen, womit der eigentliche DSB als repariert gilt. Allerdings führt die Verknüpfung der beiden Doppelstränge durch eine dHJ in späteren Prozessen wie Transkription, Mitose und Meiose zu erneuten Brüchen. Um dies zu verhindern, wird die doppelte *Holliday Junction* durch Resolution aufgelöst, indem Resolvasen an beiden HJs binden und schneiden. Durch Ligation werden die freien Enden wieder geschlossen. Je nachdem in welcher Orientierung die Resolvase an den *Holliday Junctions* schneidet, entstehen CO oder NCO Produkte (Abbildung 1.2).

Ein weiteres Modell zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen stellt das *synthesis-dependent strand-annealing*-Modell (SDSA-Modell, Nassif *et al.*, 1994) dar. Laut diesem Modell wird der invadierte Strang aus dem Doppelstrang zunächst verdrängt. Jedoch wurde der Strang bereits soweit verlängert, dass dieser schließlich an den Einzelstrangüberhang des zweiten freien Bruchendes binden kann. Entstandene Lücken werden durch Polymerasen aufgefüllt und das DNA-Rückgrat durch Ligasen verschlossen. Alle aus diesem Reparatur-Modell resultierenden Produkte, stellen NCO Produkte dar (Abbildung 1.2).

Alternativ existiert noch ein weiteres Modell zur Reparatur von DSB über HR, das als *Dissolution*-Modell bezeichnet wird (Thaler und Stahl, 1988). Laut diesem Modell, werden die beiden Kreuzungspunkte der HJs aufeinander zubewegt (*branch migration*), was zur Ausbildung einer sogenannten Hemicatenan Struktur führt (Abbildung 1.2). Innerhalb dieses Hemicatenans sind die beiden Doppelstränge mit jeweils einem ihrer Stränge topologisch verknüpft. Die Trennung der DNA-Moleküle erfolgt schließlich durch eine Typ IA Topoisomerase, indem ein Strang geschnitten und der intakte Strang durch diesen hindurch geleitet wird (Wu und Hickson, 2003). Dieses Modell führt ausschließlich zur Entstehung von NCO Produkten. Für das *branch migration* der beiden *Holliday Junctions* ist eine RecQ-Helikase verantwortlich, die die beiden Verknüpfungen aufeinander zubewegt. Erst später wurde herausgefunden, dass die RecQ-Helikase, zusammen mit der Typ I Topoisomerase und dem Strukturprotein RMI1 in einem, in allen Eukaryoten konserviert vorliegenden Komplex

interagiert (Mullen *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005; Hartung *et al.*, 2007; Hartung *et al.*, 2008). Dieser Komplex wird in Säugern als BLM-Komplex bezeichnet, da die beteiligte RecQ-Helikase die Helikase BLM darstellt. In Arabidopsis ist der Komplex als RTR-Komplex bekannt.

1.4 DNA-Quervernetzungen und ihre Reparatur

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung der Reparatur von DNA-Quervernetzungen zwischen zwei DNA-Strängen in Pflanzen, weshalb diese Schadensart in diesem Abschnitt näher beschrieben werden soll.

DNA-Quervernetzungen, auch *Crosslinks* (CLs) genannt, stellen eine spezielle Art von DNA-Schäden dar. Im Hinblick auf die Frage ob die Verknüpfung nur einen Strang betrifft oder zwischen mehreren DNA-Strängen ausgebildet ist, unterscheidet man zwischen Intrastrang- und Interstrang-CL. Beide Arten von *Crosslinks* schädigen die Zelle indem sie die DNA-Replikation stören. Intrastrang-CLs werden unter anderem durch das Genotoxin *cis*-Platin ausgelöst, welches 1965 erstmals beschrieben wurde (Rosenberg *et al.*, 1965). Dabei wurde *cis*-Platin eher zufällig entdeckt, als Rosenberg die Wirkung von Wechselstrom auf das Wachstum von *E. coli* untersuchen wollte. Er verwendete dafür Platinelektroden und konnte eine Hemmung des Zellwachstums beobachten. Nach intensiven Untersuchungen konnte er schließlich feststellen, dass die Hemmung auf den Stoff *cis*-Platin zurückzuführen ist, der sich wahrscheinlich durch die Platinelektroden gebildet hatte. Spätere Analysen ergaben, dass *cis*-Platin bevorzugt mit nukleophilen Gruppen an N7-Atomen von Purinbasen interagiert und dadurch DNA-Protein, aber auch DNA-DNA Inter- und Intrastrang-CLs induziert (Eastman, 1987). 85-90 % der CLs stellen dabei aber Intrastrang-CLs zwischen Adenin und Guanin oder zwei benachbarten Guaninbasen dar (Kelland, 1993), die sehr wahrscheinlich die Cytotoxizität des Stoffes auslösen (Pinto und Lippard, 1985). Als Folge solcher Verknüpfungen wird die Beugung der DNA-Struktur verändert (Übersicht in Siddik, 2003).

Interstrang-CLs können durch das Genotoxin Mitomycin C (MMC) induziert werden, welches ursprünglich aus *Streptomyces caespitosus* isoliert wurde (Hata *et al.*, 1956). Neben Interstrang-CLs können durch MMC aber auch Intrastrang-CLs und Monoaddukte an der DNA entstehen, wobei die Hauptprodukte Interstrang-CL darstellen (Palom *et al.*, 2002). MMC wird in der Zelle durch Reduktion aktiviert und alkyliert daraufhin die DNA. Durch diese Alkylierung werden zwei komplementäre DNA-Stränge miteinander verknüpft (Iyer und Szybalski, 1963). Es stellte sich heraus, dass MMC bevorzugt Guaninbasen in CpG Sequenzen alkyliert (Kumar *et al.*, 1992). Interstrang-CLs verzerren zwar die Struktur der DNA nicht oder nur sehr leicht, trotz allem aber stellen sie eine der toxischsten Schäden für die Zelle dar.

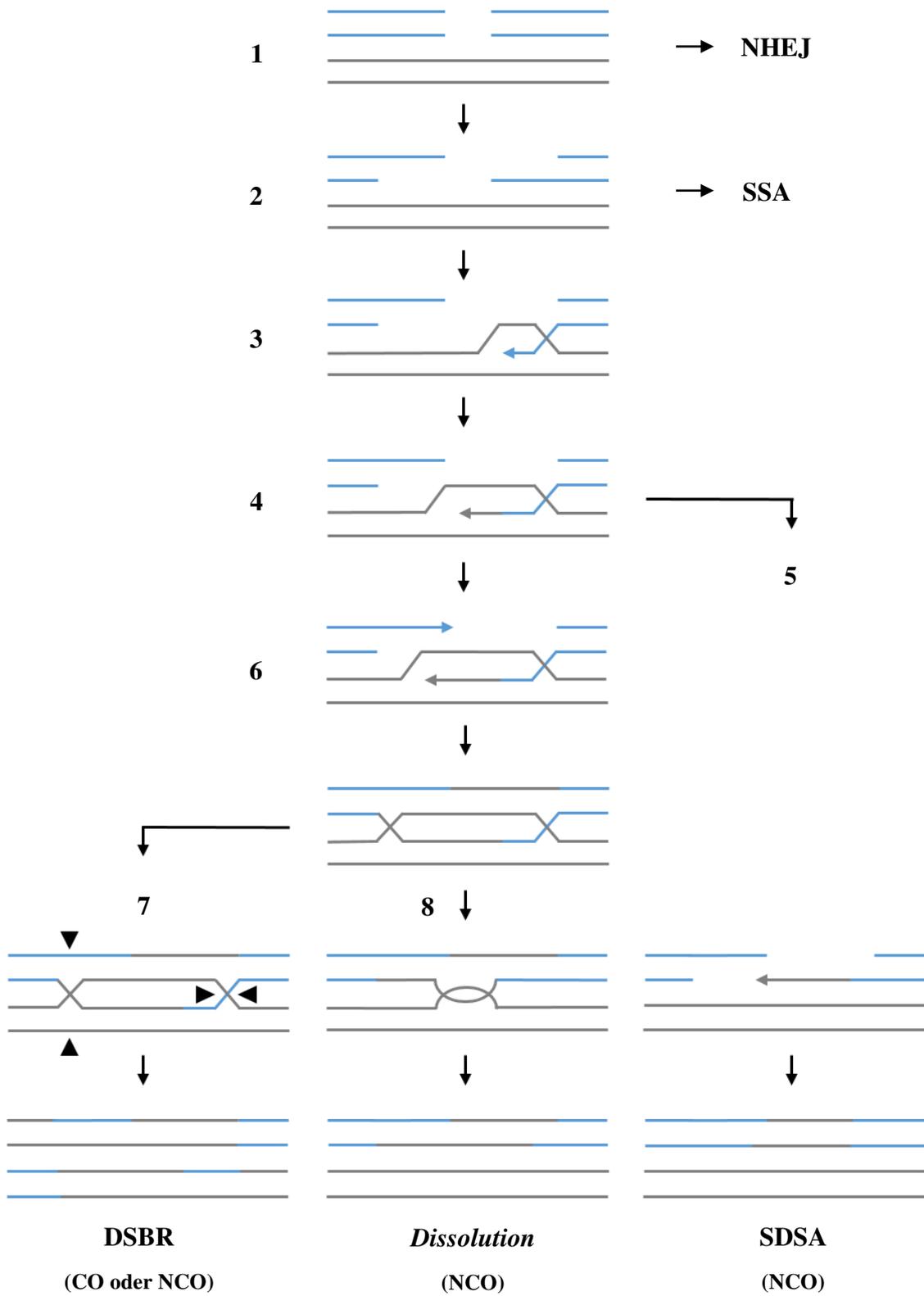


Abbildung 1.2: Doppelstrangbruchreparatur durch homologe Rekombination.
 Die Legende befindet sich auf der folgenden Seite.

Abbildung 1.2: Doppelstrangbruchreparatur durch homologe Rekombination. Abb. auf vorheriger Seite. Entsteht ein Doppelstrangbruch innerhalb der DNA (1) kann dieser über verschiedene Mechanismen repariert werden. Zum einen kann er über nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ), oder *single-strand-annealing* (SSA) entfernt werden, die allerdings beide zu Insertionen oder Deletionen führen können. Wird der Doppelstrangbruch über homologe Rekombination (HR) repariert, existieren drei unterschiedliche Modelle, wie die Reparatur ablaufen kann. Die anfänglichen Schritte sind aber in allen drei Modellen gleich. Die freien Bruchenden werden durch 5'-3'-Resektion prozessiert, so dass sich 3'-Überhänge ausbilden (2). Mit Hilfe von Proteinen kann der Einzelstrang anschließend in den intakten homologen Doppelstrang invadieren und mit diesem Basenpaarungen eingehen, wodurch sich ein sogenannter *displacement-loop* (D-loop) ausbildet (3). Ausgehend vom intakten DNA-Strang, der als Matrize verwendet wird, kann der invadierte Einzelstrang verlängert werden (4). Laut dem *synthesis-dependent strand-annealing*-Modell (SDSA) wird der invadierte Strang aus dem intakten Doppelstrang verdrängt. Allerdings wurde der Einzelstrang durch Synthese bereits so weit verlängert, dass dieser wieder Basenpaarungen mit dem zweiten freien Bruchende eingehen kann (5). Nach anschließendem Auffüllen der Lücken durch DNA-Synthese und Schließen des Rückgrats ist der DSB repariert. Aus diesem Modell gehen nur *Noncrossover* Produkte (NCO) hervor. Für die anderen beiden HR-Modelle wird der invadierte Einzelstrang weiter verlängert, so dass der D-loop Basenpaarungen mit dem zweiten freien Bruchende eingeht (6). Durch Reparatursynthese der einzelsträngigen Lücken entsteht eine sogenannte doppelte *Holliday Junction* (dHJ). An dieser Stelle trennen sich die Modelle. Im *double-strand break repair*-Modell wird (7) die dHJ durch spezifische Endonukleasen (Resolvasen) aufgelöst, indem sie Schnitte katalysieren. Je nach Orientierung der induzierten Schnitte entstehen *Crossover* (CO) oder NCO Produkte. Laut dem *Dissolution*-Modell (8) werden die beiden HJ durch sogenanntes *branch migration* aufeinander zubewegt, was zur Ausbildung eines Hemicatenans führt. Diese Struktur wird anschließend von Typ I Topoisomerasen aufgelöst. Aus diesem Reparatur-Modell gehen nur NCO Produkte hervor.

Interstrang-CLs können nicht nur durch exogene sondern auch durch endogene Faktoren induziert werden, die als Produkte beim zellulären Metabolismus entstehen. So sind gebildete Aldehyde, die bei der Lipidperoxidation oder bei der Verstoffwechslung von Kaffee oder Alkohol entstanden sind, ebenfalls in der Lage Interstrang-CLs zu verursachen (Stone *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010; Garaycochea *et al.*, 2012). Auch die spontane Hydrolyse von Purinen oder auftretende Intermediate der BER-Reparatur können zur Verknüpfung von zwei DNA-Strängen führen (Dutta *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2013). Durch diese Vernetzung von zwei verschiedenen DNA-Strängen wird die Dissoziation der Stränge bei zellulären Prozessen wie Replikation und Transkription verhindert, was bei Nichtreparatur zu Brüchen und schließlich zum Absterben der Zelle führen kann. Ein bis zwei Interstrang-CLs sind dabei letal für eine Reparatur-defiziente Hefezelle, wohingegen 20-40 Interstrang CLs für eine Reparatur-defiziente Säugerzelle tödlich sind (Magana-Schwencke *et al.*, 1982; Phillips, 1996).

cis-Platin und MMC werden heutzutage auch als Zytostatikum während der Chemotherapie bei Krebspatienten eingesetzt. Dabei sollen beide Genotoxine die DNA-Replikation stören und dadurch die Zellteilung verhindern, was schließlich die Auslösung des programmierten Zelltods (Apoptose) induziert. Aufgrund der deutlich höheren Zellteilungsrate von Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Körperzellen, sollen in erster Linie vor allem Krebszellen abgetötet werden.

Die Reparatur von *Crosslinks* ist vielseitig und umfasst mehrere Reparaturwege. Da bei Intrastrang-CLs nur ein DNA-Strang betroffen ist, kann diese Art von CLs über NER entfernt oder während der Replikation über PRR umgangen werden (Abschnitt 1.2). Interstrang-CLs schädigen zwei

DNA-Stränge, weshalb die Reparatur deutlich komplexer ist. Auch hierbei muss zwischen Replikations-unabhängiger und Replikations-abhängiger Reparatur unterschieden werden. Die Reparatur von Interstrang-CLs in nicht-replizierenden Zellen ist noch nicht grundlegend verstanden, allerdings existiert ein Modell, wie die Reparatur ablaufen könnte. Diese Reparatur könnte entweder über die Genom-übergreifende oder die Transkriptions-gekoppelte NER aktiviert werden (Abschnitt 1.2). Dies führt zur Rekrutierung von weiteren NER-Faktoren, unter anderem von Nukleasen, die den CL beidseitig von einem Strang ausschneiden, was als *unhooking* bezeichnet wird. Durch Transläsionspolymerasen kann die entstandene Lücke aufgefüllt werden und eine zweite Runde NER erfolgen, die schließlich den CL vom zweiten DNA-Strang entfernt (Übersicht in Clauson *et al.*, 2013). Die Reparatur von Interstrang-CLs während der S-Phase wird durch eine Blockierung der Replikationsgabel aktiviert, da die beiden Stränge nicht voneinander getrennt werden können. Auch zu dieser Schadensart existiert ein aktuelles Modell, wie die Reparatur ablaufen könnte. Ähnlich wie bei der Replikations-unabhängigen Reparatur wird der Interstrang-CL durch Nukleasen 5' und 3' von ihm innerhalb des Folgestrangs (*Lagging-Strang*) ausgeschnitten (*unhooking*). Das *unhooking* führt diesmal allerdings zu einem DSB im *Lagging-Strang* und zu einem Addukt im Leitstrang (*Leading-Strang*). Der *Leading-Strang* wird mittels TLS (vgl. Abschnitt 1.2) verlängert. Dies führt zu einem intakten Schwesterchromatid, welches als Template für die HR-vermittelte Reparatur des DSBs verwendet werden kann. Das Addukt im *Leading-Strang* kann anschließend noch über NER entfernt werden (Abbildung 1.3 und Übersicht in Clauson *et al.*, 2013). Involviert in die Interstrang-CL Erkennung und in den Ablauf der Reparatur in Säugern ist der Fanconi Anämie-Signalweg, der bei Ausfall zu der Erbkrankheit Fanconi Anämie führt.

1.4.1 Fanconi Anämie und der Fanconi Anämie-Signalweg

Die Fanconi Anämie (FA) wurde erstmals 1927 vom Schweizer Kinderarzt Dr. Guido Fanconi beschrieben (Fanconi, 1927). Es handelt sich hierbei um eine autosomal rezessive Erbkrankheit, die zu einer Vielzahl von Symptomen führen kann, wie etwa Knochenmarksinsuffizienz, angeborene Fehlbildungen, Unfruchtbarkeit und eine Prädisposition zur Erkrankung an Krebs. Weitere Symptome stellen Gehörschäden, Fehlbildungen im endokrinen und gastrointestinalen Bereich und Missbildungen der Gliedmaßen dar. Die Rate an Neuerkrankungen liegt heutzutage bei etwa einem Säugling von 100000 Geburten (Rosenberg *et al.*, 2011). So vielfältig die äußeren Symptome von FA sind, zeigen allerdings alle FA-Patienten auf zellulärer Ebene den gleichen Phänotyp, der auch zur Diagnostik der Erkrankung herangezogen wird: Die Zellen weisen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Interstrang-CL induzierenden Agenzien, wie beispielsweise MMC, auf (Moldovan und D'Andrea, 2009). Weiterhin sind Störungen der Zellzyklusregulation, sowie Schäden an den Chromosomen, wie Translokationen und radiale Chromosomen, zu beobachten (Schroeder *et al.*, 1964). Fanconi Anämie entsteht durch die homozygote Mutation eines der bisher 16 beschriebenen *FANC*-Genen, die alle in einem gemeinsamen

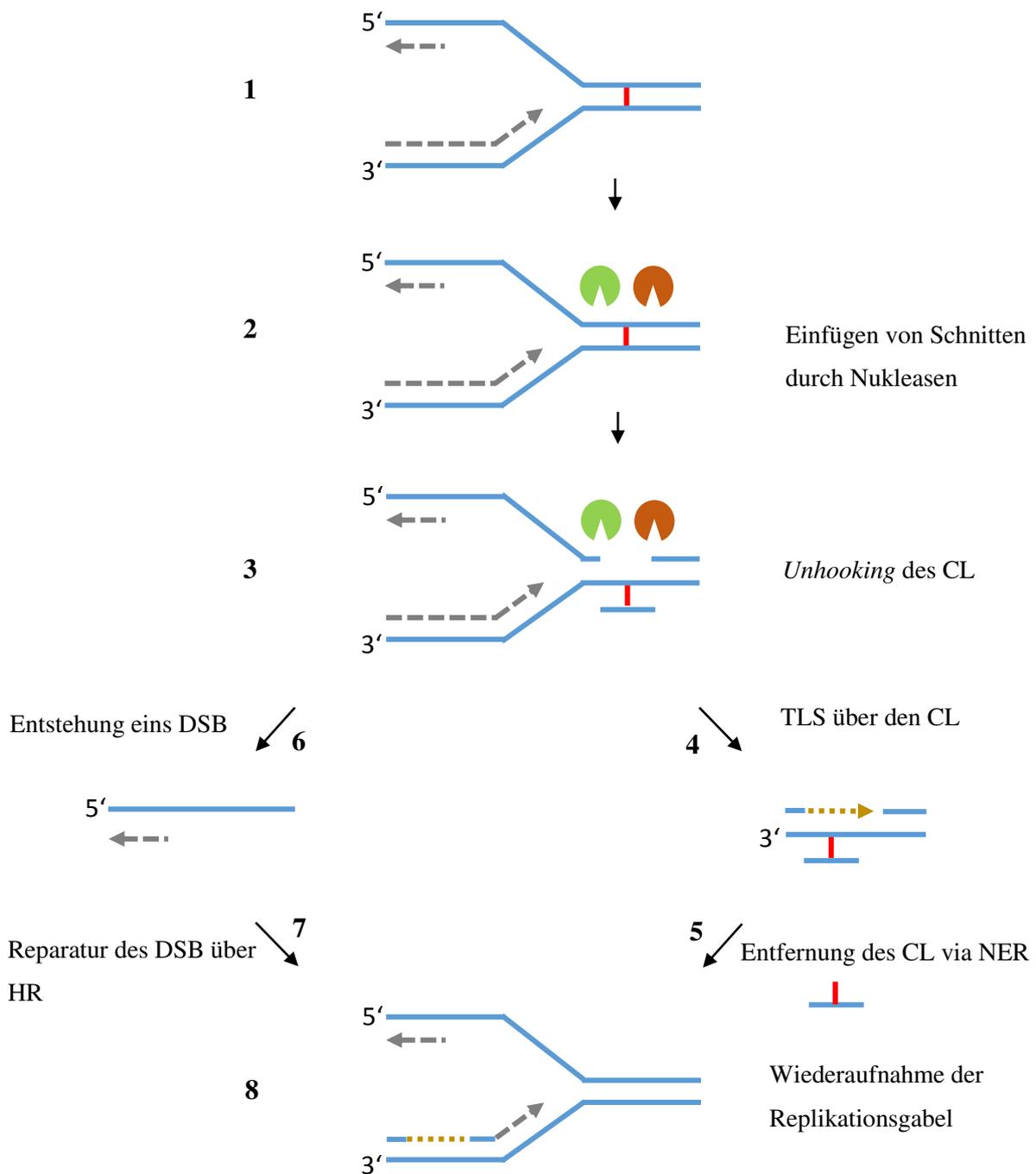


Abbildung 1.3: Modell der Reparatur von Interstrang-Quervernetzungen.

Das Auftreten einer Interstrang-Quervernetzung (*Crosslink*; CL) führt während der Replikation zur Blockierung der Replikationsgabel (1). Durch Nukleasen wird der CL beidseitig aus einem Strang ausgeschnitten (2), wodurch dieser herausklappen kann, was als *unhooking* bezeichnet wird (3). Durch Transläsionssynthese (TLS) wird über den CL hinweg synthetisiert (4). Nukleotidexzisionsreparatur-Faktoren (NER) entfernen anschließend den CL (5). Allerdings ist durch das *unhooking* auch ein einseitiger DSB entstanden (6), der über homologe Rekombination (HR) repariert wird (7). Schließlich kann die Replikation wieder aufgenommen und fortgeführt werden (8).

Signalweg agieren, dem Fanconi Anämie-Signalweg zur Reparatur von Interstrang-CLs. Durch den Ausfall des Signalwegs bei Mutation eines der *FANC*-Gene ist die Zelle einem erhöhten replikativen Stress und vermehrt auftretenden, nicht reparierten DNA-Schäden ausgesetzt, was zu einem erhöhten Level an p53 und p21 führt. Die Proteine p53 und p21 werden vermehrt bei DNA-Schäden exprimiert, was wiederum zu einem Stillstand des Zellzyklus führt, um der Zelle genügend Zeit für die Reparatur zu verschaffen. Innerhalb des Knochenmarks aber führt die verstärkte Expression der beiden Faktoren zu einer niedrigeren Proliferationsrate und damit auch zu einem Rückgang des hämatopoetischen Stammzellpools (Ceccaldi *et al.*, 2012). Viele der *FANC*-Gene übernehmen auch außerhalb des Signalwegs wichtige Funktionen in verschiedenen Reparaturwegen wie etwa der HR, was erklären würde, warum FA-Patienten besonders anfällig für die Entstehung von Krebs sind. Dadurch, dass DNA-Schäden durch den Ausfall von *FANC*-Genen vermehrt in einem nicht reparierten Zustand bleiben, erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Tumoren.

Der initiale Schritt des Fanconi Anämie-Signalwegs ist die Erkennung des Schadens durch FANCM, zusammen mit FAAP24, MHF1 und MHF2. Durch diese Erkennung wird der sogenannte FA *core* Komplex, bestehend aus den sieben FANC-Proteinen (FANCA, -B, -C, -E, -F, -G, -L) und den beiden assoziierten Proteinen FAAP20 und FAAP100, aktiviert und an den DNA-Schaden rekrutiert. Als Antwort auf den DNA-Schaden und nach Aktivierung durch FANCM überträgt der FA *core* Komplex jeweils ein Ubiquitin auf FANCI und FANCD2 (Ishiai *et al.*, 2008), die zusammen ein Heterodimer bilden, das auch als ID-Komplex bezeichnet wird. Erst diese Ubiquitinierung ermöglicht es dem ID-Komplex, Effektorproteine wie FANCD1, FANCI, FANCO, FANCN, FANCP und FANCC, sowie weitere Reparaturfaktoren zu aktivieren und an den DNA-Schaden zu rekrutieren (Abbildung 1.4).

Über die Proteine des FA *core* Komplexes ist bisher nur wenig bekannt. Es stellte sich heraus, dass die Ubiquitinligase FANCL, unabhängig von den anderen *core* Komplex Proteinen, in der Lage ist den ID-Komplex *in vitro* zu monoubiquitinieren (Ulrich und Walden, 2010). FANCG, FANCE und FANCF besitzen möglicherweise strukturenbende Funktionen innerhalb des FA *core* Komplexes. Für den N-Terminus von FANCF konnte gezeigt werden, dass es den *core* Komplex in Kontakt mit dem initialen Erkennungsprotein FANCM bringt (Deans und West, 2009). Die am häufigsten auftretenden Mutationen in FA-Patienten sind in den Genen *FANCA* und *FANCC* zu finden, die zusammen mehr als 75 % der Mutationen ausmachen. FANCA interagiert direkt mit dem FA-assoziierten Protein FAAP20, welches eine Ubiquitinbinde-Zinkfinger-Domäne 4 besitzt (UBZ4) (Ali *et al.*, 2012; Leung *et al.*, 2012), an die UBZ binden kann. UBZ wiederum ist in der Lage an K63-gebundene Polyubiquitinketten zu binden (Ali *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012) und dadurch eine Untereinheit des DNA-Polymerase zeta Komplexes der TLS zu rekrutieren. Diese Eigenschaft könnte erklären, wie die TLS und der FA-Signalweg miteinander verbunden sind (Ceccaldi *et al.*, 2012). Für FANCC konnten Funktionen außerhalb des Signalwegs in der Apoptose, der Regulation des Redoxsystems und des Zellzyklus gezeigt werden (Hadjur und Jirik, 2003; Niedzwiedz *et al.*, 2004; Pagano *et al.*, 2012). Nur sehr wenig ist über

die beiden Proteine FANCB und FAAP100 bekannt. Für FANCB konnte lediglich gezeigt werden, dass es eine Nukleuserkennungssequenz (*nucleus localization sequence*, NLS) trägt (Meetei *et al.*, 2004) und mit FANCL und FAAP100 interagiert (Medhurst *et al.*, 2006; Ling *et al.*, 2007). FAAP100, zusammen mit FAAP20 werden für die Assemblierung und Funktion des *core* Komplexes benötigt aber nicht zu den *FANC*-Genen gezählt, da noch kein FA-Patient mit einer Mutation innerhalb dieser Gene gefunden wurde (Ling *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2012).

Viele der Effektorproteine, die durch den ID-Komplex aktiviert werden, sind in den Reparaturmechanismus der homologen Rekombination involviert. Einige von ihnen wurden auch bereits anderweitig beschrieben, wie etwa FANCD1 (BRCA2), FANCI (BRIP1), FANCF (PALB2) und FANCG (RAD51C). Mutationen innerhalb dieser Gene kommen wesentlich seltener vor als in anderen *FANC*-Genen und zeigen meist schlimmere Defekte. BRCA2, als *Breast cancer susceptibility protein 2*, ist mit der Entstehung von erblichem Brustkrebs assoziiert, weshalb viele der Patienten, die in den Effektorproteinen eine Mutation tragen, Brust- oder Eierstockkrebs entwickeln. Aus diesem Grund wird der Fanconi Anämie-Signalweg häufig auch als FA/BRCA-Signalweg bezeichnet (Wang, 2007). Wie bereits erwähnt, sind viele der Effektorproteine in die HR involviert. BRCA2 (FANCD1) bindet dabei einzelsträngige DNA und rekrutiert RAD51 (Jensen *et al.*, 2010), was schließlich die Invasion des Strangs in den intakten homologen Doppelstrang katalysiert. Diese Funktion von BRCA2 wird stimuliert durch FANCF, dem *partner and localizer of BRCA2* (PALB2) (Rahman *et al.*, 2007; Reid *et al.*, 2007; Sy *et al.*, 2009). FANCI (BRIP1) stellt eine Helikase dar und ist ebenfalls in die HR Reaktion involviert (Schwab *et al.*, 2013). *FANCG* (*ERCC4*), welches für die Nuklease XPF kodiert, stellt das neueste entdeckte *FANC*-Gen dar (Bogliolo *et al.*, 2013). Zusammen mit ERCC1 bildet XPF einen Nukleasekomplex, der in den NER-Reparaturmechanismus involviert ist. Es wird vermutet, dass XPF/ERCC1 eine der Nukleasen darstellt, die das *unhooking* des CL durch Einfügen eines Schnitts auf einer Seite der Schadstelle durchführt (Klein Douwel *et al.*, 2014).

Der vollständige Fanconi Anämie-Signalweg scheint nur in Säugern konserviert vorzuliegen, da sich nur zu einzelnen *FANC*-Genen Homologe finden lassen, wie etwa in *Saccharomyces cerevisiae*, in der sich nur Homologe zu FANCM und FANCP als Mph1 und Slx4 finden lassen (Scheller *et al.*, 2000; Patel und Joenje, 2007; McVey, 2010; Daele *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2012). In *Arabidopsis* hingegen liegen die sieben *FANC*-Gene *FANCM*, *FANCL*, *FANCD2*, *FANCD1*, *FANCI*, *FANCG* und *FANCG* konserviert vor.

Da im Rahmen der Doktorarbeit Doppelmutanten mit *fancm* oder *fanci* in *Arabidopsis thaliana* untersucht wurden, werden in den folgenden zwei Abschnitten sowohl FANCM als auch FANCI ausführlicher beschrieben.

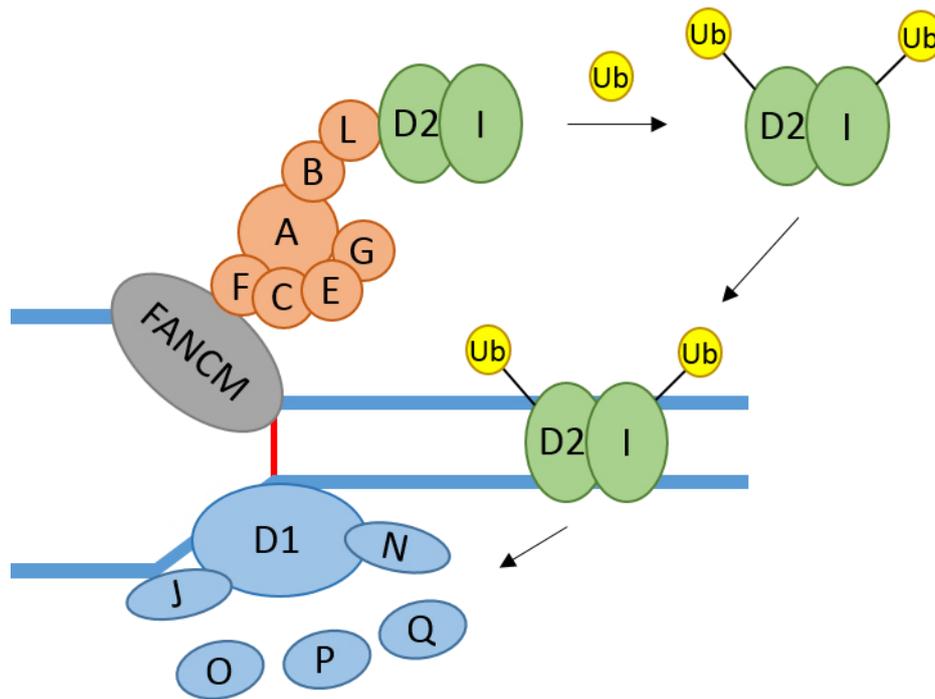


Abbildung 1.4: Fanconi Anämie-Signalweg in Säugern.

Der Fanconi Anämie (FA)-Signalweg dient in Säugern zur Reparatur von Interstrang-Quervernetzungen. Das Auftreten einer solchen Quervernetzung führt zur Blockierung der Replikationsgabel. Der initiale Schritt zur Aktivierung des FA-Signalwegs stellt die Erkennung und Bindung von FANCM an den DNA-Schaden dar. Dadurch wird der sogenannte FA *core* Komplex, der sich aus den Proteinen FANCA, -B, -C, -E, -F, -G und -L zusammensetzt, aktiviert und an die Läsion rekrutiert. Die Ubiquitinligase FANCL wiederum monoubiquitiniert (Ub) die Proteine FANCI und FANCD2, die ebenfalls einen Komplex, den ID-Komplex, ausbilden. Der auf diese Weise aktivierte ID-Komplex ist nun in der Lage, weitere Effektorproteine wie FANCD1, FANCI, FANCN, FANCO, FANCP und FANCO, sowie weitere Reparaturfaktoren, an den DNA-Schaden zu rekrutieren, um die Entfernung der Quervernetzung durchzuführen.

1.4.2 FANCM

FANCM ist das einzige der *FANC*-Gene, welches neben Tieren und Pflanzen auch Orthologe sowohl in Hefe, als auch in Archaeobakterien aufweist. So liegt es konserviert in *Saccharomyces cerevisiae* als *MPH1* und in Archaeobakterien als *HEF* vor (Scheller *et al.*, 2000; Komori *et al.*, 2002). *FANCM* besitzt am N-Terminus ein Helikasemotiv der SF2-Helikasenfamilie (Superfamilie 2), welches aus sieben konservierten Motiven besteht. Zwei der insgesamt sieben SF2-Motive sind besonders wichtig. Motiv I, auch Walker A Motiv genannt, welches für die Bindung des Triphosphatschwanzes des ATPs sorgt und Motiv II, das zweiwertige Kationen bindet und daher eine wichtige Rolle in der Hydrolyse von ATP übernimmt. Es konnte allerdings keine echte Helikaseaktivität, die die Entwindung von Doppelsträngen katalysiert, nachgewiesen werden (Whitby, 2010). Es wird vermutet, dass *FANCM* eine DNA Translokaseaktivität besitzt, die *FANCM* unter ATP-Verbrauch befähigt an der DNA entlang zu

wandern, ohne diese zu entwinden. Als Translokase könnte FANCM nach Rekrutierung des FA *core* Komplexes, diesen entlang der DNA transportieren. Diese Translokaseaktivität ist ausreichend, um *branch migration* an Replikationsgabeln und HJ-Strukturen *in vitro* zu ermöglichen (Meetei *et al.*, 2005; Gari *et al.*, 2008a; Gari *et al.*, 2008b). Am C-Terminus des menschlichen FANCM-Proteins und auch des archaebakteriellen HEF-Proteins, befindet sich eine *helix-hairpin-helix* (HhH)₂-Domäne. Durch diese Domäne ist FANCM in der Lage ein Heterodimer mit seinem Interaktionspartner FAAP24 zu bilden und dadurch an die DNA zu binden. Das Homolog in Archaeen hingegen bildet ein Homodimer aus, um auf diese Weise an die DNA binden zu können. Zusätzlich besitzen HEF und FANCM beide eine ERCC4-Nukleasedomäne, die der XPF-Familie der Nukleasen, in die auch XPF und MUS81 eingeordnet werden, gleicht (Ciccina *et al.*, 2008). Die Nukleaseaktivität ist allerdings durch Mutation essentieller Aminosäuren inaktiv (Meetei *et al.*, 2005; Ciccina *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2008). Sowohl XPF, als auch MUS81 interagieren über ihre C-terminale Endonukleasedomäne mit einem kleinen Protein, ERCC1 beziehungsweise EME1, welches essentiell für die Aktivität der Endonuklease ist. Ähnlich hierzu interagiert FANCM auch über seinen C-Terminus mit einem kleinen Protein, FAAP24. Ein Knockdown von *FAAP24* verhindert die Monoubiquitinierung von FANCD2 und erhöht ebenfalls die Sensitivität der Zellen gegenüber DNA-Quervernetzungen (Ciccina *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass FANCM zusammen mit FAAP24 den FA *core* Komplex rekrutiert und dadurch die Monoubiquitinierung von FANCD2 verursacht (Ciccina *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008).

Für FANCM konnte zusätzlich eine Funktion unabhängig von den anderen *FANC*-Genen nachgewiesen werden. Zusammen mit seinem Interaktionspartner FAAP24 und einem weiteren Protein, HCLK2, wird die Zellzykluskinase ATR aktiviert, was wiederum zur Aktivierung des Zellzyklus-Kontrollpunkts führt (Collis *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang agiert FANCM wahrscheinlich als Sensor für blockierte Replikationsgabeln und stabilisiert diese.

Im Gegensatz zu FANCM in Säugern, scheint das Homolog Mph1 in Hefe keine Funktion in der Reparatur von Interstrang-CLs zu übernehmen, da *mph1*-defiziente Zellen keine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen aufweisen. Mph1 scheint in Hefe eher an der Reparatur von Schäden beteiligt zu sein, die zu Replikationsstress führen und durch das Genotoxin Methylmethansulfonat (MMS) induziert werden (Scheller *et al.*, 2000). Ebenfalls anders als in Säugern ist die Tatsache, dass dem Mph1 Protein in Hefe die Endonuklease- und die (HhH)₂-Domäne fehlen. Allerdings weist Mph1 eine echte Helikaseaktivität auf und ist dadurch in der Lage, doppelsträngige DNA in 3'-5'-Richtung zu entwinden (Prakash *et al.*, 2005a). Weiterhin konnte für Mph1 in Hefe eine Funktion in der homologen Rekombination nachgewiesen werden, da *mph1* eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte somatische Rekombinationsrate aufweist. Zusätzlich dazu wurde gezeigt, dass die Doppelmutante aus *mph1* und *sgs1*, der RecQ-Helikase in Hefe, eine noch stärker erhöhte Rekombinationsrate besitzt, was darauf schließen lässt, dass Mph1 und Sgs1 in zwei unabhängigen Reparaturwegen agieren (Schürer *et al.*, 2004).

Erst kürzlich wurde die Funktion von FANCM in *Arabidopsis thaliana* charakterisiert (Knoll *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu FANCM in Säugern und Mph1 in Hefe konnte für FANCM in Pflanzen keine direkte Funktion innerhalb der Reparatur von DNA-Schäden gezeigt werden. Die Mutation von *FANCM* führte zu keiner erhöhten Sensitivität gegenüber CL- oder Replikationsstress-induzierenden Agenzien. Allerdings ist FANCM in Pflanzen in den somatischen homologen Rekombinationsprozess involviert, da *fancm* Mutanten eine erhöhte Rekombinationsrate im Vergleich zu Wildtyppflanzen aufzeigten. Ähnlich wie die Situation in Hefe, war die Rekombinationsrate in Doppelmutanten aus *FANCM* und der RecQ-Helikase *RECQ4A*, einem Sgs1-Homolog, deutlich erhöht, was auch hier auf eine Funktion der Proteine in zwei verschiedenen Wegen schließen lässt (Knoll *et al.*, 2012). Weiterhin wurde für AtFANCM eine Funktion in der Meiose innerhalb der Regulation der Synapsis und in der Unterdrückung von CO Ereignissen nachgewiesen (Crismani *et al.*, 2012; Knoll *et al.*, 2012).

1.4.3 FANCI

FANCI wurde erstmals 2001 als Protein beschrieben, welches mit dem C-Terminus des Brustkrebs-assoziierten Proteins BRCA1 interagiert (Cantor *et al.*, 2001). Als Helikase, die unter anderem die Entwindung von DNA-Doppelsträngen unter ATP-Verbrauch katalysiert (Cantor *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2005), wurde FANCI zuerst als BACH1 (*BRCA1 Associated C-terminal Helicase*) bezeichnet. Allerdings war bereits ein Transkriptionsfaktor als BACH1 bezeichnet worden (Oyake *et al.*, 1996), weshalb BACH1 in BRIP1 (*BRCA1 interacting protein 1*) umbenannt wurde. Erst später wurde es als *FANCI*-Gen identifiziert, was zum Namen *FANCI* führte (Levitus *et al.*, 2005; Levrán *et al.*, 2005; Litman *et al.*, 2005). Ebenso wie die Mutation anderer *FANCI*-Gene bewirkt der Ausfall von *FANCI* in Menschen auf zellulärer Ebene eine erhöhte Sensitivität gegenüber Interstrang-CL induzierenden Agenzien und verschiedene chromosomale Aberrationen (Bridge *et al.*, 2005; Litman *et al.*, 2005). Es konnte aber gezeigt werden, dass FANCI nicht für die Monoubiquitinierung des ID-Komplexes benötigt wird, wodurch ihm spätere Funktionen im FA-Signalweg zugeschrieben werden (Cybulski und Howlett, 2011; Kitao und Takata, 2011). Interessanterweise aber scheint FANCI die Bindung von monoubiquitiniertem FANCD2 an der DNA nach Induktion von Interstrang-CLs zu fördern (Zhang *et al.*, 2010). Die genaue Funktion von FANCI ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings wird FANCI eine Funktion innerhalb der Reparatur von DSBs durch homologe Rekombination zugeschrieben. Durch Untersuchungen von *fanci* Mutanten, die eine inaktive Helikasedomäne aufwiesen (Cantor *et al.*, 2004), konnte festgestellt werden, dass die Fähigkeit DSBs zu reparieren in diesen Zellen abnahm und dieser Effekt auf die fehlende Interaktion von FANCI und BRCA1 zurückzuführen war (Cantor *et al.*, 2001). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass HsFANCI die HR über eine direkte Interaktion mit HsMRE11 des MRN-Komplexes beeinflusst (Suhasini *et al.*, 2013). Dabei konnte gezeigt werden, dass FANCI über Regulation der Nukleaseaktivität von MRE11 den normalen Ablauf der homologen Rekombination

vermittelt. Der MRN-Komplex spielt während der HR eine bedeutende Rolle in der Resektion der Bruchenden, um die Stranginvasion in den intakten Doppelstrang einzuleiten (vgl. Abschnitt 1.3.3).

In *Arabidopsis thaliana* konnten durch bioinformatische Analysen zwei Homologe zum menschlichen FANCI gefunden werden, die als FANCIJA und FANCIJB bezeichnet wurden. Für AtFANCIJA wurde unter anderem eine Funktion in der HR und in der Reparatur verschiedener DNA-Schäden beschrieben (Block-Schmidt, 2010). Erst kürzlich wurde die Funktion von AtFANCIJB untersucht und es stellte sich heraus, dass AtFANCIJB an der Reparatur von Interstrang-CLs beteiligt ist (Köhler, 2014). Dabei konnte gezeigt werden, dass FANCIJB in einem gemeinsamen Signalweg mit der RecQ-Helikase RECQ4A agiert und auch in den Reparaturweg der ATPase RAD5A involviert ist. Weiterhin wurde festgestellt, dass FANCIJB und die Nuklease MUS81 in parallelen Signalwegen zur Interstrang-CL Reparatur agieren müssen. RECQ4A, RAD5A und MUS81 stellen wichtige Proteine in der Reparatur von Interstrang-CLs in *Arabidopsis thaliana* dar, weshalb in Abschnitt 1.4.6 näher auf die Funktionen eingegangen werden soll.

1.4.4 MHF1

MHF1 (Mph1/FANCM-associated histone fold protein 1) bildet zusammen mit seinem Interaktionspartner MHF2 einen Komplex, der als MHF-Komplex bezeichnet wird. Dieser Komplex ist in der Lage doppelsträngige DNA zu binden und mit FANCM zu interagieren, wodurch die Translokaseaktivität von FANCM verstärkt wird (Singh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010). FANCM interagiert dabei direkt nur mit MHF1, wohingegen MHF2 indirekt über Protein-Protein-Interaktion mit MHF1 an FANCM bindet. In Vertebraten identifizierten Co-Immunopräzipitationsexperimente das MHF Heterodimer als Interaktionspartner des FA core Komplexes (Singh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010). Als Folge davon ist MHF auch in die korrekte Assoziation des FA core Komplexes mit Chromatin involviert. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass MHF verzweigte DNA-Duplexstrukturen erkennt und bindet, die ein typisches Merkmal von DNA-Intermediaten darstellen und sowohl während der DNA-Replikation, als auch während der Reparatur von DNA-Schäden auftreten können (Zhao *et al.*, 2014). MHF könnte hierbei die Spezifität für FANCM bezüglich verzweigter DNA-Intermediate erhöhen, die während der HR oder der Regression der Replikationsgabel auftreten können. Außerdem postulierten Zhao und Kollegen, dass die Interaktion von MHF und FANCM die korrekte Positionierung von FANCM an den DNA-Schaden erhöht und dadurch die Bindung von FANCM an andere Duplex-DNA Bereiche unterdrückt. Beide MHF Proteine besitzen eine typische *histone-fold* Domäne, die sie zur Protein-Protein aber auch zur Protein-DNA-Interaktion befähigt (Arents und Moudrianakis, 1993). Kristallstrukturanalysen ergaben, dass MHF1 und MHF2 ein Heterotetramer bilden, welches eine starke Ähnlichkeit zu dem von den Histonen H3 und H4 gebildeten Heterotetramer aufweist (Tao *et al.*, 2012). Die Mutation von *MHF* in Säugern führt zu einer reduzierten Aktivität des Fanconi

Anämie-Signalwegs und einer Zunahme an chromosomalen Aberrationen. Weiterhin weisen *MHF*-defiziente Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Interstrang-CL induzierenden Agenzien und dem Genotoxin Camptothecin (CPT) auf (Singh *et al.*, 2010). CPT ist ein Hemmstoff der Topoisomerase I, die in die Auflösung von superspiralisierter DNA durch Einfügen eines Schnitts innerhalb der DNA-Struktur involviert ist. CPT stabilisiert dabei den Topoisomerase I-DNA-Komplex, wodurch die DNA nicht wieder religiert werden kann.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der Großteil (~ 75%) an *MHF*/*FANCM*-Komplexen jedoch ohne den *FA core* Komplex existieren (Yan *et al.*, 2010), was zu der Annahme führt, dass *MHF*/*FANCM* auch vom *core* Komplex unabhängige Aufgaben übernehmen kann.

Darüber hinaus scheint *MHF1*, zusammen mit *MHF2*, auch noch *FANCM*-unabhängige Funktionen innerhalb der Zelle zu besitzen. *MHF1* und *MHF2* sind beide Bestandteile des *CCAN* (*constitutive centromere-associated network*), weshalb sie ursprünglich auch als *CENP-S* und *CENP-X* bezeichnet wurden (Amano *et al.*, 2009; Nishino *et al.*, 2012). Innerhalb des *CCAN* sind *MHF1* und *MHF2*, zusammen mit anderen *CENP*-Proteinen, für eine korrekte Ausbildung der Kinetochore an den Centromeren beteiligt, um eine fehlerfreie Segregation der Chromosomen zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang zeigen *MHF*-defiziente HeLa- und DT40-Zellen verschiedene Defekte während der Mitose, die mit einer längeren Übergangsphase von Pro- zur Anaphase und mit Brücken zwischen Anaphasechromosomen einhergehen (Amano *et al.*, 2009).

Ebenso wie sein Interaktionspartner *FANCM* scheint *MHF1* auch evolutionär gesehen stark konserviert vorzuliegen, da es ebenfalls Homologe in Pflanzen und Hefe aufweist (Singh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010; Dangel *et al.*, 2014). In Hefe allerdings scheint *Mhf1* nicht an der Reparatur von Interstrang-CLs beteiligt zu sein, da *mhf1*-defiziente Hefezellen nur eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem methylierenden Agens Methylmethansulfonat zeigen. Allerdings konnte für *Mhf1* in *Saccharomyces pombe* eine Beteiligung an der Meiose gezeigt werden, da es hierbei zusammen mit *Mhf2*, *Fml1* (das Ortholog von *FANCM* in *S. pombe*) unterstützt, CO- in NCO-Ereignisse umzuwandeln (Lorenz *et al.*, 2012).

1.4.5 FAN1

Wie bereits weiter oben beschrieben, werden durch die Monoubiquitinierung des ID-Komplexes innerhalb des *FA*-Signalwegs die *FA* Effektorproteine aber auch weitere Reparaturfaktoren an den Interstrang-CL rekrutiert. Einer dieser weiteren Reparaturfaktoren stellt die Nuklease *FAN1* (Fanconi/*FANCD2* associated nuclease 1) dar (Kratz *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; MacKay *et al.*, 2010; Smogorzewska *et al.*, 2010). *FAN1*-defiziente Zellen in Säugern zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Interstrang-CLs, weshalb auf eine Funktion von *FAN1* in der Reparatur von

DNA-Quervernetzungen durch den FA-Signalweg geschlossen wurde. Das FAN1 Protein ist modular aufgebaut und setzt sich aus mehreren Domänen zusammen. N-terminal befindet sich eine Ubiquitinbinde-Zinkfinger-Domäne (UBZ), wohingegen am C-Terminus eine VRR-Nukleasedomäne (*virus-type replication-repair domain*) vorhanden ist. Weiterhin besitzt FAN1 noch eine SAP DNA-Bindedomäne (SAP, *SAF-A/B, Acinus and PIAS*). Aufgrund der UBZ-Domäne kann FAN1 mit monoubiquitiniertem FANCD2 interagieren und wird dadurch an den DNA-Schaden rekrutiert (Kratz *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; MacKay *et al.*, 2010; Smogorzewska *et al.*, 2010; Abbildung 1.5). Ohne diese Interaktion wird FAN1 nicht an den DNA-Schaden befördert. Im Hinblick auf diese Tatsache konnte außerdem gezeigt werden, dass diese UBZ-Domäne dabei direkt an den Ubiquitinrest bindet und essentiell für die Funktion von FAN1 ist (Liu *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu aber scheint die Focusbildung von FANCD2 an Interstrang-CLs nicht von FAN1 abhängig zu sein (Kratz *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; MacKay *et al.*, 2010; Smogorzewska *et al.*, 2010). Die VRR-Nukleasedomäne vermittelt FAN1 eine 5'-3'-Exonuklease- und eine Endonukleaseaktivität, die bevorzugt Strukturen schneidet, die in 5'-Überhängen resultieren (Kratz *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; MacKay *et al.*, 2010; Smogorzewska *et al.*, 2010; Pennell *et al.*, 2014;). Zur Auflösung des Interstrang-CL muss dieser beidseitig an einem Strang ausgeschnitten werden (vgl. Abschnitt 1.4). Im Verdacht hierzu stehen die Nukleasekomplexe MUS81-EME1 und XPF(FANCDQ)-ERCC1 (Hanada *et al.*, 2006; Hanada *et al.*, 2007; Bhagwat *et al.*, 2009; Bogliolo *et al.*, 2013). Interessanterweise präferieren beide Nukleasekomplexe Strukturen, die in 3'-Überhängen resultieren, was die entgegengesetzte Polarität zur

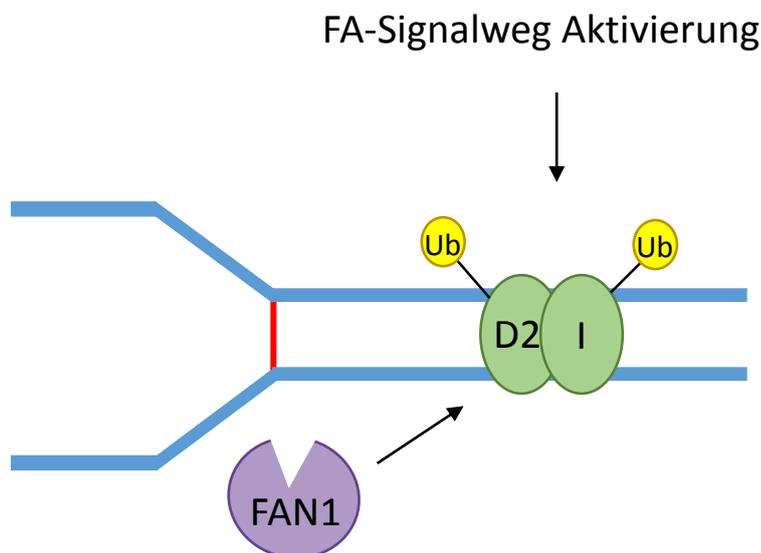


Abbildung 1.5: Rekrutierung von FAN1 an DNA-Quervernetzungen.

Nach Aktivierung des Fanconi Anämie (FA)-Signalwegs wird das Heterodimer FANCD1/FANCD2 (ID-Komplex) ubiquitiniert (Ub). Aufgrund dieser Ubiquitinierung wird die FAN1-Nuklease an den DNA-Schaden rekrutiert. Die genaue Funktion von FAN1 ist bisher noch unbekannt, allerdings könnte FAN1 als Nuklease in den *unhooking* Prozess involviert sein, innerhalb dessen die Quervernetzung ausgeschnitten wird.

Nuklease FAN1 darstellt. Aufgrund dieser Tatsache wird vermutet, dass FAN1, zusammen mit MUS81 und/oder XPF, an dem Prozess des *unhooking* innerhalb des FA-Signalwegs beteiligt ist (Ciccia *et al.*, 2008). Allerdings scheint dies nicht in allen Organismen, in denen FAN1 konserviert vorliegt, der Fall zu sein. In *Xenopus* konnte gezeigt werden, dass der Abbau von FAN1 keinen Effekt auf die Reparatur von Interstrang-CLs ausübte (Klein Douwel *et al.*, 2014). Auch wenn zusätzlich noch die Nuklease MUS81 fehlt, wurde die Interstrang-CL Reparatur in *Xenopus* nicht beeinflusst. Nichtsdestotrotz werfen Douwel und Kollegen trotzdem die Vermutung auf, dass FAN1 dennoch am *unhooking* beteiligt sein könnte und dabei redundant zu einer anderen Endonuklease agieren könnte (Klein Douwel *et al.*, 2014).

Weiterhin konnte für HsFAN1 gezeigt werden, dass es möglicherweise eine Funktion innerhalb der Mitose übernimmt. In Zellzyklusexperimenten konnte festgestellt werden, dass FAN1 zum Ende der Mitosephase hin degradiert wird und dabei wahrscheinlich vom APC/C-Komplex (*Anaphase-promoting complex/cyclosome*) reguliert wird (Lai *et al.*, 2012). Der APC/C-Komplex stellt den Hauptregulator für den zeitlichen Ablauf der Mitose dar. Innerhalb des FA-Signalwegs interagiert FAN1 mit monoubiquitiniertem FANCD2, welches allerdings während der Mitose nicht exprimiert wird (Taniguchi *et al.*, 2002). Diese Tatsache wirft die Vermutung auf, dass FAN1 möglicherweise vom FA-Signalweg unabhängige Funktionen in der Zelle ausübt, wofür die Beteiligung an der Mitose ein Beispiel sein könnte (Lai *et al.*, 2012).

Bisher wurde noch kein FA-Patient gefunden, der aufgrund einer Mutation innerhalb des *FAN1*-Gens an dieser Krankheit leidet. Allerdings werden Mutationen in *FAN1* mit einem chronischen Nierenleiden (Karyomegale interstitielle Nephritis) (Zhou *et al.*, 2012), Schizophrenie und Autismus in Verbindung gebracht (Ionita-Laza *et al.*, 2014).

FAN1 scheint nicht vollständig konserviert vorzuliegen. Es lassen sich zwar Homologe in den meisten Eukaryoten finden, allerdings konnte in *Drosophila* noch kein Homolog identifiziert werden. Interessanterweise existiert ein FAN1 Homolog in *S. pombe*, aber nicht in *S. cerevisiae*. Die Charakterisierung von SpFan1 ergab, dass es ebenfalls an der Reparatur von Interstrang-CLs beteiligt ist (Fontebasso *et al.*, 2013). Die genaue Funktion von SpFan1 konnte bisher allerdings noch nicht gezeigt werden. Es besitzt zwar eine Nukleasedomäne und eine DNA-Bindedomäne, ob Fan1 aber wirklich als Nuklease innerhalb der Interstrang-CL Reparatur in *S. pombe* agiert bleibt ungewiss. Eine UBZ-Domäne ist in SpFan1 nicht zu finden. In *Arabidopsis thaliana* ist ebenfalls ein Homolog zu FAN1 zu finden. Jedoch wurden dessen Funktionen bisher noch nicht beschrieben, weshalb AtFAN1 im Rahmen dieser Arbeit funktionell charakterisiert werden sollte.

1.4.6 Die Reparatur von DNA-Quervernetzungen in Pflanzen

Wie bereits beschrieben, liegen in *Arabidopsis thaliana* nicht alle *FANC*-Gene konserviert vor. Es konnten nur Homologe zu *FANCM* und *FANCL* des FA core Komplexes und zu *FANCD2*, *FANCD1*, *FANCI*, *FANCO* und *FANCD3* gefunden werden. Bis auf AtFANCI (Abschnitt 1.4.3) konnten noch keinem der bisher untersuchten *FANC*-Gene Funktionen in der Reparatur von Interstrang-CLs in Pflanzen zugeschrieben werden (Knoll *et al.*, 2012; Köhler, 2014). Entgegen der Tatsache, dass in Säugern der Fanconi Anämie-Signalweg der Hauptreparaturmechanismus von Interstrang-CLs darstellt, scheint sich die CL-Reparatur in Pflanzen davon zu unterscheiden. Es wurde bereits gezeigt, dass die Proteine RECQ4A, RAD5A und MUS81 eine bedeutende Rolle in der Intrastrang-CL-Reparatur in *Arabidopsis* spielen und dabei in drei unabhängigen Signalwegen agieren (Mannuss *et al.*, 2010). Im Hinblick auf die Reparatur von Interstrang-CLs wurde eine Funktion für RAD5A und MUS81, ebenfalls in parallelen Signalwegen, beschrieben (Mannuss *et al.*, 2010). Da für die vorliegende Arbeit die Proteine RECQ4A, RAD5A und MUS81 eine wichtige Rolle spielen, werden die Funktionen in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

RECQ4A zählt zu den RecQ-Helikasen, einer hochkonservierten Helikasenfamilie, die in für die Zelle essentielle Prozesse wie Replikation, Reparatur und Rekombination involviert sind und dadurch die genomische Stabilität gewährleisten. In einzelligen Organismen existiert nur eine RecQ-Helikase, wie etwa Sgs1 in *Saccharomyces cerevisiae*, wohingegen in Menschen fünf RecQ-Helikasen vorhanden sind. Drei der menschlichen RecQ-Helikasen sind mit schweren Erbkrankheiten assoziiert. Die Mutation der RecQ-Helikasen BLM, WRN und RECQ4 führen zu Bloom-, Werner- und Rothmund-Thomson Syndrom (German *et al.*, 1965; Epstein *et al.*, 1966; Ellis *et al.*, 1995; Kitao *et al.*, 1999). In *Arabidopsis thaliana* konnten sieben RecQ-Helikasen identifiziert werden (Hartung und Puchta, 2006). Es wurde gezeigt, dass RECQ4A in *Arabidopsis* das Homolog zur menschlichen BLM und zur Hefe RecQ-Helikase Sgs1 darstellt (Hartung *et al.*, 2007). AtRECQ4A ist involviert in die Reparatur von Intrastrang-CLs und Replikations-assoziierten Schäden, die durch *cis*-Platin und MMS induziert werden (Mannuss *et al.*, 2010). Weiterhin ist AtRECQ4A eine Komponente des RTR Komplexes, der sich aus einer RecQ-Helikase, einer Typ IA Topoisomerase und dem Strukturprotein RMI1 zusammensetzt (vgl. Abschnitt 1.3.3). Dieser Komplex ist in die Unterdrückung von spontanen Rekombinationsereignissen in somatischen Zellen involviert (Hartung *et al.*, 2007).

Rad5 stellt eine DNA-abhängige ATPase der SNF2-Familie dar und übernimmt in Hefe eine wichtige Funktion in der PRR. Rad5 in Hefe ist in der Lage die Regression der Replikationsgabel zu fördern (Blastyak *et al.*, 2007). Im Menschen sind zwei Homologe von Rad5 zu finden, die als SHPRH und HLTF bezeichnet werden und als Tumorsuppressor agieren (Motegi *et al.*, 2006; Unk *et al.*, 2006; Motegi *et al.*, 2008; MacKay *et al.*, 2009; Unk *et al.*, 2010). Weiterhin konnte für HLTF gezeigt werden, dass es die Wiederaufnahme von blockierten Replikationsgabeln fördert (Blastyak *et al.*, 2010). In

Arabidopsis thaliana liegen vier Rad5 Homologe vor, die als RAD5A, B, C und X bezeichnet werden. Es stellte sich allerdings heraus, dass nur RAD5A in die Reparatur von DNA-Schäden involviert ist (Chen *et al.*, 2008). Dabei zeigten *Atrad5A* Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber CLs, induziert durch *cis*-Platin und MMC, und gegenüber Replikations-assoziiierter Schäden, induziert durch MMS (Chen *et al.*, 2008). Durch Untersuchung der Doppelmutanten mit *Atmus81* oder *Atrecq4A* bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber *cis*-Platin konnte festgestellt werden, dass beide Proteine in einem unabhängigen Reparaturweg zu AtRAD5A agieren (Mannuss *et al.*, 2010).

MUS81 ist eine Endonuklease, die zusammen mit ihrem Interaktionspartner EME1 einen Nukleasekomplex bildet, der verschiedene DNA-Intermediate wie blockierte Replikationsgabeln, *Displacement loops* und *Holliday Junctions* auflösen kann (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Kaliraman *et al.*, 2001). Die Mutation von *MUS81* in menschlichen Zelllinien führt zur Hypersensitivität gegenüber Replikationsstress-induzierenden Agenzien wie Hydroxyurea (HU), wohingegen *mus81*-defiziente Zellen in Hefe eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMS, UV-Strahlung und HU aufweisen (Boddy *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001). In *Arabidopsis thaliana* ist ebenfalls ein Homolog von MUS81 zu finden und es wurde gezeigt, dass AtMUS81 an der Reparatur von verschiedenen DNA-Schäden involviert ist, die durch die Genotoxine *cis*-Platin, MMC und MMS verursacht werden (Hartung *et al.*, 2006). Die zusätzliche Mutation des Gens der RecQ-Helikase *AtRECQ4A* in *Atmus81* Mutanten führt zu schweren Entwicklungsdefekten und synthetischer Letalität, was andeutet, dass RECQ4A und MUS81 in zwei parallelen Wegen zur Reparatur blockierter Replikationsgabeln agieren (Mannuss *et al.*, 2010).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Der Fanconi Anämie-Signalweg ist in Säugern ein wichtiger Signalweg zur Reparatur von Interstrang-CLs. Bisher wurden 16 *FANC*-Gene identifiziert, die bei Mutation zur Fanconi Anämie führen und deren Produkte alle gemeinsam im FA-Signalweg agieren. Neben den *FANC*-Genen sind auch mehrere Fanconi-assoziierte Proteine an der Reparatur von Interstrang-CLs beteiligt. Zwei dieser Fanconi-assoziierten Proteine sind das *histone-fold* Protein MHF1 und die Nuklease FAN1. Innerhalb des FA-Signalwegs ist MHF1 in die Erkennung und Bindung des DNA-Schadens durch das FANC-Protein FANCM involviert, wobei MHF1 die korrekte Assoziation von FANCM an den Interstrang-CL fördert. Die Nuklease FAN1 wird durch Aktivierung des FA-Signalwegs an den DNA-Schaden rekrutiert, jedoch konnte die genaue Funktion von FAN1 bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Allerdings wird angenommen, dass FAN1 in den *unhooking* Prozess zur Entfernung des Interstrang-CL involviert ist. In *Arabidopsis thaliana* liegen MHF1 und FAN1 konserviert vor, allerdings wurde ihre Funktion bisher noch nicht beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mittels molekulargenetischer und cytologischer Methoden die Funktionen der Homologe von MHF1 und FAN1 in Arabidopsis näher untersucht werden. Dazu wurden T-DNA Insertionsmutanten dieser Gene verwendet und auf mögliche Defekte innerhalb der Reparatur verschiedener DNA-Schäden, insbesondere der Reparatur von Interstrang-CLs, überprüft. Neben der Rolle in der Reparatur von DNA-Schäden, sollten mögliche Funktionen der beiden Proteine innerhalb der homologen Rekombination durch Verwendung einer Rekombinations-Reporterlinie untersucht werden. Durch Generierung und Analyse verschiedener Doppelmutanten sollte mit diesen Methoden die Einordnung und Beteiligung der Proteine in bereits bestehende Reparatur- und Rekombinationswege erfolgen. Weiterhin sollte durch Meiozytenpräparation der *mhf1* Mutantenlinien die Funktion von MHF1 innerhalb des Ablaufs der Meiose untersucht werden. Für FAN1 sollte eine Untersuchung der Stammzellen im Wurzelmeristem Aufschluss über eine mögliche Funktion innerhalb der Reparatur spontaner und durch Interstrang-CLs induzierter Replikationssschäden geben. Weiterhin sollte durch Komplementationsanalysen untersucht werden, ob verschiedene Domänen von FAN1 für die Funktion innerhalb der Interstrang-CL Reparatur essentiell sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Binokulare und Mikroskope

- Stemi DV4 (Carl Zeiss, Göttingen)
- SZB 300 (VWR International, Darmstadt)
- LSM 700 Laser Scanning Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen) mit Zeiss AxioCam HRm

Reinraumbänke

- et130V Sicherheitswerkbank (Ehret, Emmendingen)
- NU-480-500E (INTEGRA Biosciences, Fernwald)
- Typ KVF (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen)
- Uniflow UVU 700 (UniEquip, Planegg)

Heizblöcke, Schüttler, Inkubatoren

- Anzuchtsschrank CU-36L4 (Percival Scientific, Inc., Perry, USA)
- Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
- Trockenschrank UE 500 (Mettler, Schwabach)

Zentrifugen

- CM-70M.07 Schüttelzentrifuge (neoLab, Heidelberg)

- MiniSpin Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)
- Z 233 M-2 (Hermle Labortechnik, Wehningen)
- Z 383 K (Hermle Labortechnik, Wehningen)

Thermocycler

- Flexcycler (Analytik Jena, Jena)
- iCycler (BioRad, München)
- LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Mannheim)
- Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg)
- SensoQuest Labcycler 48 (SensoQuest, Göttingen)
- Tpersonal Thermocycler (Biometra, Göttingen)

Waagen

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

Sonstige Geräte

- Elektroporator: Gene Pulser II sowie Pulse Controller Plus und Capacitance ExtenderPlus (BioRad, München)
- GEL iX Imager Geldokumentationssystem (Intas, Göttingen)
- PURELAB Classic Reinstwasseranlage (ELGA LabWater, Celle)
- Qubit Fluorometer (Invitrogen, Darmstadt)
- TKA high purity water system (Thermo Electron, Niederelbert)

Software und Datenbanken

- ClustalOmega (European Bioinformatics Institute
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; letzter Zugriff 25.09.14)
- Ensembl Genomes (<http://ensemblgenomes.org/>; letzter Zugriff: 01.09.14)
- FinchTV 1.4 (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>; letzter Zugriff 29.08.14)
- In-Fusion® Primer Online Tool der Firma Clontech
(<http://bioinfo.clontech.com/infusion/convertPcrPrimersInit.do>; letzter Zugriff 22.08.2011)
- InterProScan (European Bioinformatics Institute,
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>; letzter Zugriff 13.01.14)
- Lasergene Suite 5.03 (DNASStar Inc., Madison, Wisconsin, USA)
- LightCycler® 480 1.5 (Roche, Mannheim)
- MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)
- NCBI Nucleotide (National Center for Biotechnology Information;
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>; letzter Zugriff 02.09.14)
- OligoAnalyzer 1.0.3 (Kuulasmaa; Kuopio, Finland)
- pDRAW32 1.1.114 (AcaClone software)
- Plasmideditor ApE 2.0.47 (<http://en.bio-soft.net/plasmid/ApE.html>, Utah, USA)
- The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/>; letzter Zugriff 01.09.14)
- Zen 2011 Blue (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen)

2.1.2 Chemikalien

Standardchemikalien wurden über die Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Serva Electrophoresis (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München) oder VWR International (Darmstadt) in der Regel in *p.a.* Qualität bezogen und werden nicht weiter aufgeführt.

- Acetosyringon (Sigma-Aldrich, München)
- Agarose SeaKem LE Agarose (Lonza, Basel, Schweiz)
- Benzylaminopurin (BAP, Duchefa, Haarlem, Niederlande)
- dNTP-Gemisch (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)
- GeneRuler 1kb DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)
- LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim)
- Murashige & Skoog Fertigmedium (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)
- Natriumhypochlorit 12 % (Carl Roth, Karlsruhe)
- Plant Agar (Duchefa Biochemie, 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, Haarlem, Niederlande)

2.1.3 Medien

Alle Medien wurden mit ddH₂O angesetzt und nach Einstellen des pH-Werts autoklaviert. Für Festmedien wurde vor dem Autoklaviergang die angegebene Menge Plant Agar zugegeben. Falls eine Zugabe von Antibiotika erforderlich war, wurden diese erst nach Abkühlen des Mediums auf unter 50 °C steril zugeführt.

Medium zur Pflanzenanzucht

- GM-Medium (*Germination Medium*)
4,9 g/l Murashige & Skoog Fertigmedium, 10,0 g/l Saccharose, 7,6 g/l Plant Agar
(für Festmedien), pH 5,7

Medium zur Pflanzentransformation

- Infiltrationsmedium
2,0 g/l Murashige & Skoog Fertigmedium, 40 g/l Saccharose, 3,4 µl Benzylaminopurin [1 mg/ml], pH 5,7; vor Gebrauch des Mediums wurden 800 µl Acetosyringon [100 mg/ml] und 400 µl Silwet Gold zu 1 l Infiltrationsmedium hinzugegeben.

Medien zur Bakterienkultur

Escherichia coli

- LB-Medium (*Lysogeny Broth* Medium)
10,0 g/l Pepton, 5,0 g/l Hefe-Extrakt, 10,0 g/l NaCl, 17,5 g/l Plant Agar (für Festmedien), pH 7,0

Agrobacterium tumefaciens

- YEB-Medium (*Yeast Extract Broth* Medium)
5,0 g/l Beef-Extrakt, 5,0 g/l Pepton, 1,0 g/l Hefe-Extrakt, 5,0 g/l Saccharose, 0,49 g/l MgSO₄, 12,0 g/l Plant-Agar (für Festmedien)

2.1.4 Genotoxine und Antibiotika

Genotoxine

- Bleomycinsulfat (Selleckchem, München)
- Camptothecin (CPT) (Sigma-Aldrich, München)
- *cis*-Diamin-dichlorid-platin (II) (*cis*-Platin) (Sigma-Aldrich, München)
- Hydroxyharnstoff (Hydroxyurea, HU) (Sigma-Aldrich, München)
- Methylmethansulfonat (MMS) (Sigma-Aldrich, München)
- Mitomycin C (MMC) (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)

Antibiotika

Eine Übersicht über die verwendeten Antibiotika mit Stock- und Endkonzentrationen ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Antibiotika.

Aufgeführt sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika mit Angabe der Stock- und Endkonzentrationen für die Anzucht der verschiedenen Organismen.

Antibiotikum	Stockkonzentration	<i>A. thaliana</i>	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Cefotaxim	250 mg/ml	500 mg/l		
Gentamycin	100 mg/ml			20 mg/l
DL-Phosphinotricin (PPT)	20 mg/ml	6 mg/l		
Rifampicin	100 mg/ml			100 mg/l
Spectinomycin	100 mg/ml		100 mg/l	100 mg/l

2.1.5 Puffer und Lösungen

DNA-Isolierungen

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

Agarose-Gelelektrophorese

- Ladepuffer (6x)
0,2 % Orange G, 0,05 % Xylencyanol, 10 % Glycerin, 60 mM EDTA
- SB-Gele
0,9 % Agarose in 400 ml 1x SB-Puffer, 15 µl 1 % Ethidiumbromid

- SB-Puffer (20x)
8 g/l NaOH, 47 g/l Borsäure, pH 8,0
- TAE-Gele
0,9 % Agarose in 400 ml 1x TAE-Puffer, 15 µl 1 % Ethidiumbromid
- TAE-Puffer (50x)
242 g/l Tris, 57,1 ml/l Eisessig, 100 ml/l 0,5 M EDTA, pH 8,0
- Kristallviolett-Gele
0,8 % Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer, 20 µl 10 mg/ml Kristallviolett

Meiocytenpräparationen

- 0,01 M Citratpuffer
4,45 ml 0,1 M Natriumcitrat, 5,55 ml 0,1 M Zitronensäure, pH 4,5, mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen
- Fixierlösung
37,5 ml Ethanol absolut, 12,5 ml 100 % Essigsäure
- Verdaulösung
1 % Cellulase, 1 % Pectolyase, gelöst in 0,01 M Citratpuffer; Lagerung bei -20 °C
- DAPI-Lösung
1 µl/mg DAPI in 1 µg/ml antifade Medium, Vectashield; Lagerung bei 4 °C

Histochemische Färbung

- 100 mM Phosphatpuffer
39 ml 200 mM NaH₂PO₄, 61 ml 200 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, mit ddH₂O auf 200 ml auffüllen

- X-GlcA Färbelösung
1,0 ml Natriumazid-Lösung (5 % in H₂O), 2,5 ml X-Glc-A-Stammlösung (1 % in Dimethylformamid), mit 100 mM Phosphatpuffer auf 50 ml auffüllen

2.1.6 Enzyme

- Cellulase (C1794, Sigma-Aldrich, München)
- DNaseI (Qiagen, Hilden)
- DreamTaq DNA Polymerase (5 U/μl, 10x Amplifikationspuffer, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)
- Pectolyase (P5936, Sigma-Aldrich, München)
- Phusion High Fidelity DNA Polymerase [2 U/μl] (Finnzymes, Vantaa, Finnland,)
- PRECISOR High Fidelity DNA Polymerase [2 U/μl] (BioCat, Heidelberg)
- RNaseH (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)
- RNaseT1 (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)
- Taq-DNA-Polymerase (Herstellung am eigenen Lehrstuhl, 10x Amplifikationspuffer 160 mM Ammoniumsulfat, 670 mM Tris, 25 mM MgCl₂, 0,1 % Tween 20, pH 8,8 mit HCl)
- Terminale Desoxyribonukleotidtransferase (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)

2.1.7 Kits

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim)
- In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, USA)
- LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim)
- Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab, Erlangen)
- Qubit dsDNA Broad Range Assay Kit (Life Technologies, Darmstadt)
- Qubit RNA Broad Range Assay Kit (Life Technologies, Darmstadt)
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, St. Leon-Rot)

- RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden)

2.1.8 Organismen

Escherichia coli

- NEB5 α (Grant *et al.*, 1990)

Genotyp: F - recA1 endA1 hsdR17 (r k -, m k +) supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1

Dieser Stamm wurde zur Vermehrung von Plasmiden verwendet.

Agrobacterium tumefaciens

- GV3101::pMP90 (Koncz *et al.*, 1984)

Dieser Stamm wurde für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit den verschiedenen Plasmiden verwendet. Er besitzt als chromosomalen Marker ein Rifampicin-Resistenzgen. Das enthaltene, modifizierte Ti-Plasmid pTiC58 Δ T-DNA vermittelt eine Resistenz gegenüber Gentamycin.

Arabidopsis thaliana

- Ökotyp Columbia (Col-0)
- IC9 Reporterlinie im Col-0 Hintergrund (Molinier *et al.*, 2004)

Zur Charakterisierung verschiedener Gene wurden T-DNA Insertionsmutanten verwendet, die in Tabelle 2.2 dargestellt sind.

Tabelle 2.2: Verwendete Insertionslinien.

In der Tabelle aufgeführt sind jeweils der Genlocus, die Mutantenbezeichnung, die Herkunft und die jeweilige Erstbeschreibung der Mutanten.

Genlocus	Gen	Mutante	T-DNA Insertion	Charakterisierung
At5g50930	<i>MHF1</i>	<i>mhf1-1</i>	SALK_119435	diese Arbeit
		<i>mhf1-2</i>	WiscDsLox 507A09	diese Arbeit

Genlocus	Gen	Mutante	T-DNA Insertion	Charakterisierung
At1g48360	<i>FAN1</i>	<i>fan1-1</i>	GABI_815C08	diese Arbeit
At1g35530	<i>FANCM</i>	<i>fancm-1</i>	SALK_069784	Knoll <i>et al.</i> , 2012
At4g30870	<i>MUS81</i>	<i>mus81-1</i>	GABI_113F11	Hartung <i>et al.</i> , 2006
At5g22750	<i>RAD5A</i>	<i>rad5A-2</i>	SALK_047150	Chen <i>et al.</i> , 2008
At1g10930	<i>RECQ4A</i>	<i>recq4A-4</i>	GABI_203C07	Hartung <i>et al.</i> , 2007
At1g20720	<i>FANCB</i>	<i>fancb-1</i>	SALK_079991	Köhler, 2014

2.1.9 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Plasmid pSBO-2 verwendet. Dieses Plasmid basiert auf dem pPZP201 Vektor der pPZP200-Familie (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) und ist sowohl für die Vermehrung in *E. coli* als auch in *A. tumefaciens* geeignet. Zur Bakterienselektion trägt der pPZP201 Vektor eine Streptomycin/Spectinomycin Resistenzkassette. Für die Herstellung des pSBO-2 Plasmids wurde zuerst über die *Hind*III-Schnittstelle der *Multiple Cloning Site* (MCS) ein *BAR Open Reading Frame* unter der Kontrolle des 35S-Promotors und -Terminators eingebracht (Bonnet, 2009). Das *BAR*-Gen wurde zur Pflanzenselektion verwendet und vermittelt eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum DL-Spectinomycin. Zusätzlich wurde die MCS von 8 auf 17 Restriktionsschnittstellen erweitert.

2.2 Methoden

Pflanzenspezifische Methoden

2.2.1 Lagerung von Saatgut

Arabidopsis Saatgut wurde trocken und dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Anzucht im S1-Gewächshaus

Die Kultivierung der Pflanzen, die zur Materialgewinnung, Kreuzung, Transformation oder zur Blüterernte benötigt wurden, erfolgte im S1-Gewächshaus. Zur Stratifikation wurden die Samen vor der Aussaat über Nacht in Leitungswasser und bei 4 °C inkubiert. Ausgesät wurden die Samen auf einem 1:1 Gemisch aus Floraton 3 (Floragard) und Vermiculit (2-3 mm, Deutsche Vermiculite-Dämmstoff GmbH) und bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16 h Licht/8 h Dunkel bei etwa 22 °C kultiviert.

Anzucht im Anzuchtsschrank

Die Kultivierung der Pflanzen für Versuche, bei denen exakt gleich bleibende Bedingungen erforderlich waren, erfolgte in Pflanzenanzuchtsschränken des Typs CU-36L4. Dabei betrug der Tag/Nacht-Rhythmus 16 h Licht bei 22 °C und 8 h Dunkel bei 20 °C.

Anzucht im Anzuchtsraum

Die Kultivierung der Pflanzen, die für Segregationanalysen auf Selektionsmedium angezogen wurden, erfolgte im Anzuchtsraum bei 16 h Licht und 8 h Dunkel bei einer Temperatur von etwa 24 °C.

2.2.3 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis thaliana*

Zur Anzucht von *Arabidopsis thaliana* Samen unter axenischen Bedingungen wurde die benötigte Anzahl an Samen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß abgefüllt. Alle folgenden Schritte fanden steril an einer Reinraumbank statt. Zuerst wurden die Samen in 300 µl 70 % Ethanol für 1 min inkubiert und anschließend für 10 s bei 6000 UPM zentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanols folgte ein Waschschrift mit 500 µl sterilem ddH₂O und erneutem Zentrifugationsschritt (10 s, 6000 UPM). Zur Sterilisation wurden die Samen für 8 min in 4 % Natriumhypochloritlösung (frisch hergestellt aus 12 % Natriumhypochlorit) schüttelnd inkubiert und erneut abzentrifugiert (10 s, 6000 UPM). Auf diesen Schritt folgten drei weitere Waschschriffe mit ddH₂O (10 s, 6000 UPM) bevor die Samen zur Stratifikation über Nacht in ddH₂O bei 4 °C inkubiert wurden.

2.2.4 Kreuzungen

Zur Generierung verschiedener Doppel- und Dreifach-T-DNA Insertionsmutanten und zum Einbringen des Rekombinationsreporterkonstrukts in Mutantenlinien wurden Kreuzungen durchgeführt. Hierfür wurden von der jeweiligen Mutterpflanze alle offenen und auch zu kleine Blüten und bereits gebildete

Schoten entfernt. Pro Blütenstand wurde von je 2–3 geeigneten Blüten der Fruchtknoten frei präpariert, indem die Kelch-, Kron- und Staubblätter entfernt wurden. Zur Bestäubung wurde von der Vaterpflanze eine bereits geöffnete Blüte entfernt und mit den Staubblättern über die Narbe des Fruchtknotens der Mutterpflanze gestrichen. Um die bestäubten Blüten zu markieren, wurden diese mit einem farbigen Band versehen. Die gekreuzten Pflanzen wurden bis zur Samenreife weiter im S1-Gewächshaus kultiviert. Nachwachsende Triebe und Blüten wurden in regelmäßigen Abständen entfernt.

2.2.5 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte mittels der sogenannten „*Floral Dip*“ Methode (Clough und Bent, 1998). Zuvor wurde das jeweilige Konstrukt in Agrobakterien eintransformiert (Abschnitt 2.2.25).

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde zunächst eine Vorkultur aus 50 ml YEB-Medium, angeimpft mit 1 Bakterienkolonie, angesetzt und für einen Tag bei 28 °C und 200 UPM inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Hauptkultur angesetzt, die sich aus 400 ml YEB-Medium, 500 µl Vorkultur und den spezifischen Antibiotika zusammensetzte. Nach erneuter Inkubation für einen Tag bei 28 °C und 200 UPM erfolgte die eigentliche Arabidopsis Transformation. Zur Vorbereitung wurden von den zu transformierenden Pflanzen alle offenen Blüten und bereits gebildete Schoten entfernt. Zum Infiltrationsmedium wurde erst jetzt 800 µl Acetosyringon hinzugefügt. Die Agrobakterien Hauptkultur wurde abzentrifugiert (15 min, 20 °C, 4500 UPM) und das entstandene Pellet in Infiltrationsmedium resuspendiert. Unmittelbar vor dem Transformationsvorgang wurden 400 µl Silwet Gold zur Lösung hinzugefügt. Anschließend wurden die Pflanzen kopfüber und bis zur Rosette in die ständig rührende Agrobakterien Lösung getaucht und für etwa 30 s inkubiert. Die auf diese Weise behandelten Pflanzen wurden liegend über Nacht in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Wanne im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakterienlösung mit Leitungswasser vorsichtig abgespritzt und die Pflanzen wieder aufgestellt. Die Kultivierung bis zur Samenreife der Pflanzen erfolgte im S1-Gewächshaus.

2.2.6 Etablierung transgener Linien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene T-DNA Konstrukte mittels Agrobakterien-basierter Transformation in *Arabidopsis thaliana* eingebracht (Abschnitt 2.2.5). Für die späteren Untersuchungen wurden von jeder Transformation mehrere genetisch unterschiedliche Linien ausgewählt, welche die T-DNA homozygot und nur an einem Ort im Genom (*single-locus*) integriert hatten. Zur Selektion wurde das auf der T-DNA enthaltene PPT-Resistenzgen verwendet.

Identifikation von Primärtransformanden (T1-Generation)

Zur Identifikation der Primärtransformanden wurde das Saatgut der transformierten Pflanzen sterilisiert (Abschnitt 2.2.3) und in 0,1 % Agaroselösung aufgenommen. Am folgenden Tag wurden die Samen auf GM-haltigen Petrischalen mit PPT und Cefotaxim ausgebracht und nach etwa zwei Wochen Inkubation im Anzuchtraum ausgewertet. Diejenigen Pflanzen, die aufgrund der aufgenommenen T-DNA samt Resistenzgen wuchsen, wurden durch Selbstung vermehrt.

Identifikation von *single-locus* Linien (T2-Generation)

Zur Identifikation von *single-locus* Linien wurde das Saatgut der Primärtransformanden sterilisiert und genau 52 Samen der jeweiligen Linie auf eine GM-haltige Petrischale mit PPT ausgebracht. Nach etwa zwei Wochen im Anzuchtraum wurden die Linien auf PPT-Resistenz untersucht. Gemäß der Mendelschen Regeln sollte eine Linie in der T2-Generation, welche die T-DNA nur an einem Ort im Genom integriert hat (*single-locus*), 1:2:1 aufspalten (homozygot : heterozygot : Wildtyp). Demnach sind 75 % der Pflanzen aufgrund der homozygot oder heterozygot enthaltenen T-DNA in der Lage zu wachsen, wohingegen 25 % wegen fehlender T-DNA absterben. Zeigen die Pflanzen ein anderes Aufspaltungsmuster, so ist die T-DNA an mehreren Loci integriert. Die statistische Auswertung der Aufspaltung erfolgte mittels dem χ^2 -Test, mit dem kritischen Wert $\chi^2(1; 0,95)$, wobei insgesamt 52 Pflanzen betrachtet wurden. Die identifizierten *single-locus* Linien wurden wieder durch Selbstung vermehrt.

Identifikation von homozygoten *single-locus* Linien (T3-Generation)

In der T3-Generation wurden die *single-locus* Linien auf homozygotes Vorliegen der T-DNA untersucht. Hierfür wurden die Pflanzen wieder auf Selektionsmedium mit PPT ausgebracht und nach etwa zwei Wochen Wachstum ausgewertet. War die T-DNA homozygot enthalten, waren alle Pflanzen in der Lage zu wachsen, wohingegen heterozygote Linien in ihrem Wachstum wieder aufspalteten. Das Saatgut der homozygoten *single-locus* Linien wurde anschließend für Komplementationsexperimente verwendet.

2.2.7 Sensitivitätstest

Zur Bestimmung der Sensitivität von T-DNA Insertionsmutanten gegenüber verschiedenen Genotoxinen wurden Sensitivitätstests durchgeführt. Diese können Aufschluss über eine mögliche Funktion der in den Mutanten ausgeschalteten Gene in der DNA-Reparatur geben. Hierfür werden T-DNA Insertionsmutanten mit Genotoxinen behandelt, die zu spezifischen DNA-Schäden führen. Weist eine Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Sensitivität bezüglich eines Genotoxins auf,

ist es wahrscheinlich, dass das funktionsfähige Gen normalerweise in die Reparatur dieser Schadensart involviert ist.

Die Samen der untersuchten Linien wurden zuerst sterilisiert (Abschnitt 2.2.3) und anschließend auf GM-haltigen Petrischalen ausgebracht. Nach einer Woche Inkubation im Anzuchtsschrank wurden die Keimlinge in 6-Well Plates in flüssiges GM-Medium umgesetzt. Hierfür wurden zuvor 4 ml Flüssigmedium für die Genotoxinansätze, beziehungsweise 5 ml flüssiges GM für die Ansätze ohne Genotoxinzugabe vorgelegt und genau 10 Pflanzen pro Well überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte wieder im Anzuchtsschrank. Am darauffolgenden Tag wurde das zu testende Genotoxin in 1 ml dazugegeben, so dass das Endvolumen in jedem Well genau 5 ml betrug (Konzentration der getesteten Genotoxine siehe Tabelle 2.3). Die Kontrollansätze ohne Genotoxinzugabe wurden pro 6-Well Plate doppelt angesetzt. Genau zwei Wochen nach Umsetzen der Pflanzen in Flüssigmedium wurde das Frischgewicht der Pflanzen pro Well bestimmt. Überschüssige Flüssigkeit wurde dafür zuvor mit Hilfe eines Papiertuchs entfernt. Zur Auswertung wurde aus den doppelten Kontrollansätzen der Mittelwert gebildet und anhand dessen das prozentuale Frischgewicht der behandelten Pflanzen bestimmt. Durch mindestens drei unabhängige Wiederholungen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt und in Form eines Säulendiagramms aufgetragen.

Tabelle 2.3: Genotoxinzugabe bei Sensitivitätstests.

In der Tabelle sind die getesteten Genotoxine, mit Angabe der Stocklösungen und verwendeten Endkonzentrationen angegeben.

Genotoxin	Stocklösung	Endkonzentrationen				Einheit
Bleomycin	1 mg/ml	0,5	1	2	5	µg/ml
Cisplatin	1 mM	5	10			µM
CPT	10 mM	150	300			nM
HU	20 mM	0,5	1	2	4	mM
MMC	1 mg/ml	5	10	15	20	µg/ml
MMS	10 %	20	40	60	100	ppm

2.2.8 Zelltodanalyse in Wurzeln

Die Zelltodanalyse in Wurzeln ist eine Methode, um die Beteiligung eines bestimmten Gens an der Reparatur spontaner oder durch ein Genotoxin induzierter Replikationsschäden zu untersuchen. Hierzu

wurde der Farbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet, der nur tote Zellen anfärbt, da dieser die Membran von lebenden Zellen nicht passieren kann.

Für die Analyse wurden die Samen der zu untersuchenden Linien oberflächensterilisiert (Abschnitt 2.2.3), auf GM-Platten ausgebracht und für vier Tage im Anzuchtsschrank inkubiert. Anschließend wurden die Keimlinge in 5 ml flüssiges GM-Medium für die Kontrollansätze ohne Genotoxinbehandlung und in MMC-haltiges Flüssigmedium für die Genotoxinansätze, umgesetzt. Die getestete Konzentration von MMC betrug dabei 2,5 µg/ml. Nach 18 h Inkubation im Anzuchtsschrank wurden die Pflanzen in flüssigem GM-Medium gewaschen und auf Objektträger überführt. Zum Anfärben der toten Zellen wurde je Objektträger 100 µl 5 µg/ml PI verwendet. Ausgewertet wurden die Präparate mit Hilfe des LSM 700 Mikroskops.

2.2.9 Rekombinationstest

Um zu überprüfen, ob die zu charakterisierenden Gene in die Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination involviert sind, wurden die Insertionsmutanten mit Hilfe von Rekombinationstests untersucht. Hierfür wurden die Mutanten mit der IC9 Reporterlinie gekreuzt (Molinier *et al.*, 2004). Diese Reporterlinie enthält ein *GUS* Gen, welches in Form von zwei nicht-funktionsfähigen Teilen vorliegt, die allerdings einen etwa 700 bp langen homologen Bereich aufweisen. Die beiden Fragmente US und GU liegen in direkter Orientierung nacheinander, wodurch eine Restauration des *GUS* Gens nur durch interchromosomale Rekombination möglich ist.

Für die Rekombinationstests wurde das Saatgut der homozygot etablierten Mutanten im IC9 Hintergrund sterilisiert (Abschnitt 2.2.3) und auf GM-haltigen Petrischalen ausgebracht. Die Samen wurden anschließend eine Woche im Anzuchtsschrank kultiviert, bevor sie in flüssiges GM-Medium umgesetzt wurden. Dabei wurden 50 Keimlinge einer Linie in eine Hälfte einer zweigeteilten Petrischale mit 9 ml für Genotoxinansätze, beziehungsweise mit 10 ml vorgelegtem Flüssigmedium für Kontrollansätze überführt und im Anzuchtsschrank weiter kultiviert. War eine Genotoxinzugabe erforderlich, wurde dies am darauffolgenden Tag in 1 ml zugegeben. Nach sieben Tagen wurden die Pflanzen schließlich für die histochemische Färbung vorbereitet. Dafür wurden die Pflanzen in 50 ml Kunststoffröhrchen überführt und nach Zugabe von 6 ml Färbelösung für zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Um auf eine für die Reaktion ausreichende Sauerstoffzufuhr zu achten, wurden die Deckel der Kunststoffröhrchen nur lose aufgesetzt. Zur besseren Auswertung wurden die Blattfarbstoffe der Pflanzen durch Inkubation über Nacht in 70 % Ethanol bei 60 °C extrahiert, bevor die Anzahl der blauen Sektoren pro Pflanze an einem Binokular bestimmt wurde.

2.2.10 Präparation männlicher Meiozyten

Die Präparation männlicher Meiozyten diente der cytologischen Untersuchung von Meiosestadien und wurde gemäß den Vorgaben nach Armstrong *et al.*, 2009 durchgeführt. Hierfür wurden die primären Blütenstände in frisch hergestellte Fixierlösung überführt. Nach etwa 1 h und nochmals am Folgetag wurde die Lösung auf eine mögliche Verfärbung untersucht und gegebenenfalls ausgetauscht.

Zur Herstellung der Präparate wurden je 3-4 Blütenstände in ein schwarzes Präparierschälchen überführt und alle bereits geöffneten und sichtbar gelb gefärbten Knospen mit Hilfe einer Pinzette entfernt. Verbliebene Knospen wurden vereinzelt und der Stängel wurde entfernt. Anschließend wurde die Fixierlösung abgesaugt und zweimal mit 0,01 M Citratpuffer für 5 min gewaschen, wobei aufschwebende Knospen untergetaucht wurden. Anschließend wurden die Blüten in 1 ml Verdauungslösung für 1,25 h in einer Feuchtekammer bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Verdauungslösung mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und der Verdauprozess mit sterilem kaltem Leitungswasser abgestoppt. Je 2-3 Blüten ähnlicher Größe wurden auf einen Objektträger überführt und überschüssiges Wasser mit einem Papiertuch entfernt. Die Blüten wurden mit einer flexiblen Präpariernadel zerdrückt, wobei darauf zu achten war, dass die Blüten nicht austrockneten. Nach Zugabe von 7 µl 70 % Essigsäure wurde der Objektträger auf einer Heizplatte bei 45 °C für etwa 30 s inkubiert und die Zellsuspension mit der Präpariernadel verrührt, bis sich die Essigsäure zu einem Tropfen in der Mitte des Objektträgers zusammenzog. Der Objektträger wurde von der Heizplatte genommen und der Essigsäuretropfen zuerst mit 1 ml Fixierlösung umkreist und anschließend mit 1 ml Fixierlösung abgespült. Das Präparat wurde von der Rückseite aus mit einem Fön getrocknet. Zur Färbung der DNA wurde jeder Objektträger mit 10 µl DAPI-Lösung versehen und mit einem Deckglas verschlossen. Überschüssiges DAPI wurde dabei vorsichtig mit einem Papiertuch entfernt. Die hergestellten Präparate wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet.

In vitro Methoden

2.2.11 Schnelle DNA-Isolierung aus *A. thaliana*

Zur Genotypisierung von Pflanzen wurde die DNA mittels einer schnellen DNA-Isolierungsmethode extrahiert. Hierfür wurde ein Blatt der zu genotypisierenden Pflanze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe eines Pistills gemörsert. Nach Zugabe von 500 µl Shorty-Extraktionspuffer wurde die Probe für 5 min bei 12000 UPM zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurden 300 µl des Überstands in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem zuvor 300 µl Isopropanol vorgelegt wurden. Die Proben wurden gemischt und für 10 min bei 14000 UPM zentrifugiert. Der Überstand

wurde anschließend abgossen und das Pellet über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Je nach Blattgröße wurde das Pellet in 50-200 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.2.12 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR-Methode ist eine Technik zur Vervielfältigung von DNA-Molekülen. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde sie zur Genotypisierung von Pflanzen, zur Herstellung von Klonierungsfragmenten, zur genauen Bestimmung des 5'-UTR Bereichs eines Gens und zum Nachweis von transformierten Bakterien verwendet. Abhängig von der Zielsetzung wurde die entsprechende Polymerase verwendet und die Reaktionsbedingungen angepasst. Für PCR-basierte Genotypisierungen wurde ein Reaktionsansatz von 25 µl, für andere PCR-Reaktionen ein Ansatz von 50 µl verwendet. Die Schmelztemperatur (T_m) der eingesetzten Primer wurde mit folgender Formel berechnet:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 * (\text{G} + \text{C}) + 2 * (\text{A} + \text{T})$$

PCR-basierte Genotypisierung von Pflanzen

Mittels der PCR-basierten Genotypisierung von Pflanzen wurde untersucht, welchen Genotyp die verwendeten T-DNA Insertionsmutanten besaßen. Als Polymerase wurde entweder die Dream Taq Polymerase oder die Taq Polymerase aus eigener Herstellung mit spezifischen Reaktionsbedingungen verwendet (Abschnitt 2.1.6). Für die Auswertung der Genotypisierung wurde zwischen homozygot (T-DNA auf beiden Allelen integriert), heterozygot (T-DNA nur auf einem Allel integriert) und Wildtyp (T-DNA nicht integriert, Wildtypallel vorhanden) unterschieden. Um eine integrierte T-DNA zu identifizieren, wurde ein genspezifischer und ein T-DNA spezifischer Primer verwendet (Abbildung 2.1 A). Hierbei konnte nur ein Produkt entstehen, wenn die T-DNA im Gen vorhanden war. Zur Identifikation des Wildtypallels wurden zwei genspezifische Primer verwendet, die allerdings so gewählt wurden, dass ihr PCR-Produkt die T-DNA überspannt. Aufgrund der relativ kurz gewählten Elongationszeit und der Größe der T-DNA konnte mit diesem Primerpaar nur ein Produkt entstehen, wenn keine T-DNA integriert war. Für Mutanten, die die T-DNA homozygot integriert hatten, ergab nur die erste, T-DNA spezifische PCR ein Amplikon (Abbildung 2.1 B). Bei heterozygoten Mutanten erhielt man ein Produkt sowohl bei der T-DNA spezifischen, als auch bei der Wildtyp PCR. Pflanzen, die keine T-DNA integriert hatten, ergaben nur mit den Wildtyp Primern ein Produkt.

PCR für Klonierungen

Für Klonierungen wurde entweder die Phusion oder die Precisor Polymerase verwendet (Abschnitt 2.1.6). Diese Polymerasen besitzen eine Korrekturlesefunktion und weisen daher nur eine sehr geringe Fehlerquote auf, wodurch gewährleistet wird, dass die Sequenzinformation des entstehenden Fragments zum Ausgangsprodukt gleich bleibt.

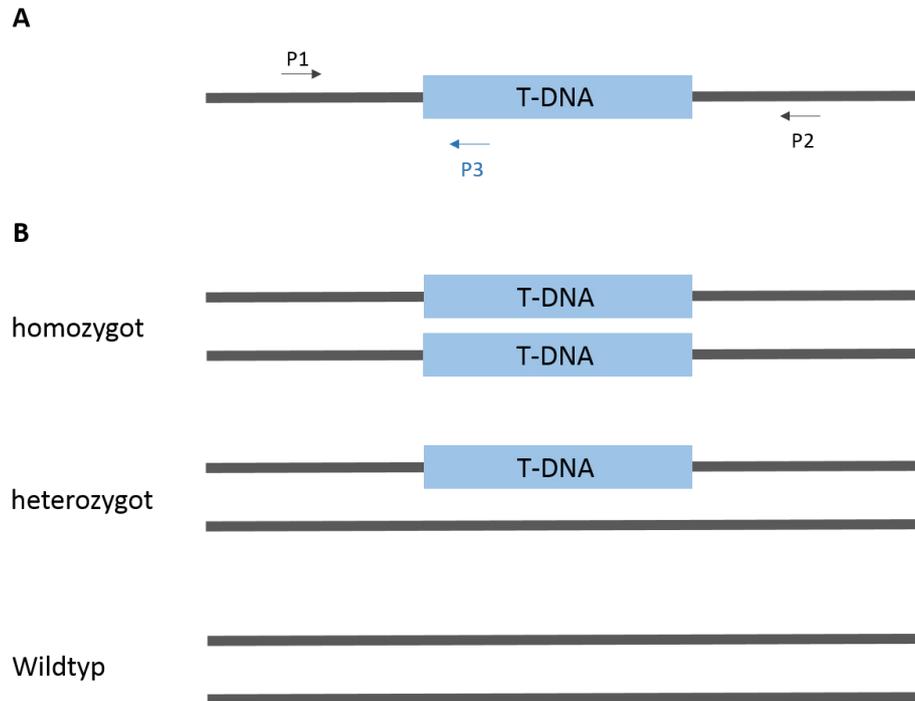


Abbildung 2.1: Genotypisierung von Insertionsmutanten.

(A) Für die Genotypisierung von T-DNA Insertionsmutanten wurden verschiedene Primerkombinationen verwendet. P1 und P2 stellen zwei genspezifische Primer dar, die nur ein Produkt liefern, falls keine T-DNA integriert ist. Für die Identifikation der integrierten T-DNA wurde der genspezifische Primer P1 und ein T-DNA spezifischer Primer P3 verwendet. (B) Mögliche Kombinationen des Genotyps von Insertionsmutanten. Liegt eine T-DNA homozygot, demnach auf beiden Allelen eines Gens vor, so liefert nur die T-DNA spezifische PCR ein Produkt. Im Falle von heterozygot, wobei ein Allel mit inserierter T-DNA und ein Wildtypallel vorliegen, führen beide Primerkombinationen zu einem Produkt. Liegen beide Allele in der Wildtypform, demnach ohne integrierte T-DNA, vor, ist nur die PCR mit den genspezifischen Primern in der Lage ein Amplikon zu liefern.

Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde verwendet, um zu überprüfen, ob ein in *E. coli* eintransformiertes Plasmid das gewünschte Insert enthält. Nach Transformation der Bakterien mit dem Plasmid (Abschnitt 2.2.23) wurden diese auf Nährmedium ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die gewachsenen Klone für die Kolonie-PCR eingesetzt. Durch Verwendung eines Insert-spezifischen und eines Plasmid-spezifischen Primers konnte identifiziert werden, welche Bakterienklone das Plasmid samt Insert trugen.

5' RACE PCR

Die 5' RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) PCR wurde verwendet, um die genaue Basenabfolge des 5' Endes einer cDNA zu erhalten (Abbildung 2.2 (1-6)). Dafür wurde die Gesamt-RNA von zwei Wochen alten Keimlingen mit dem RNeasy Plant Mini Kit extrahiert (Abschnitt 2.2.19) und die cDNA mittels eines genspezifischen Primers (GSP1) und des RevertAid First-Strand cDNA Synthesis Kits

hergestellt (Abschnitt 2.2.20). Um die restlichen RNA-Moleküle abzubauen, wurde ein Gemisch aus RNaseH und RNaseT1 im Verhältnis 1:1 verwendet und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Dabei sorgt RNaseH für die hydrolytische Spaltung von RNA-Bestandteilen in RNA-DNA-Heteroduplexen, wohingegen RNaseT1 einzelsträngige RNA abbaut. Anschließend wurde die cDNA aufgereinigt (Abschnitt 2.2.14) und in 30 µl ddH₂O eluiert. Mittels einer terminalen Desoxyribonukleotidtransferase (tDt) wurde an das 3' Ende der cDNA ein Poly-C Schwanz angehängt. Hierfür wurde die cDNA zuerst mit dCTPs und dem tDt Puffer bei 94 °C für 3 min inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 µl tDt und Inkubation bei 37 °C für 15 min wurde der Poly-C Schwanz ans 3' Ende der cDNA angehängt. Zur Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte eine Inkubation bei 64 °C für 10 min. Im folgenden Schritt wurde eine PCR-Reaktion mit einem zweiten genspezifischen Primer

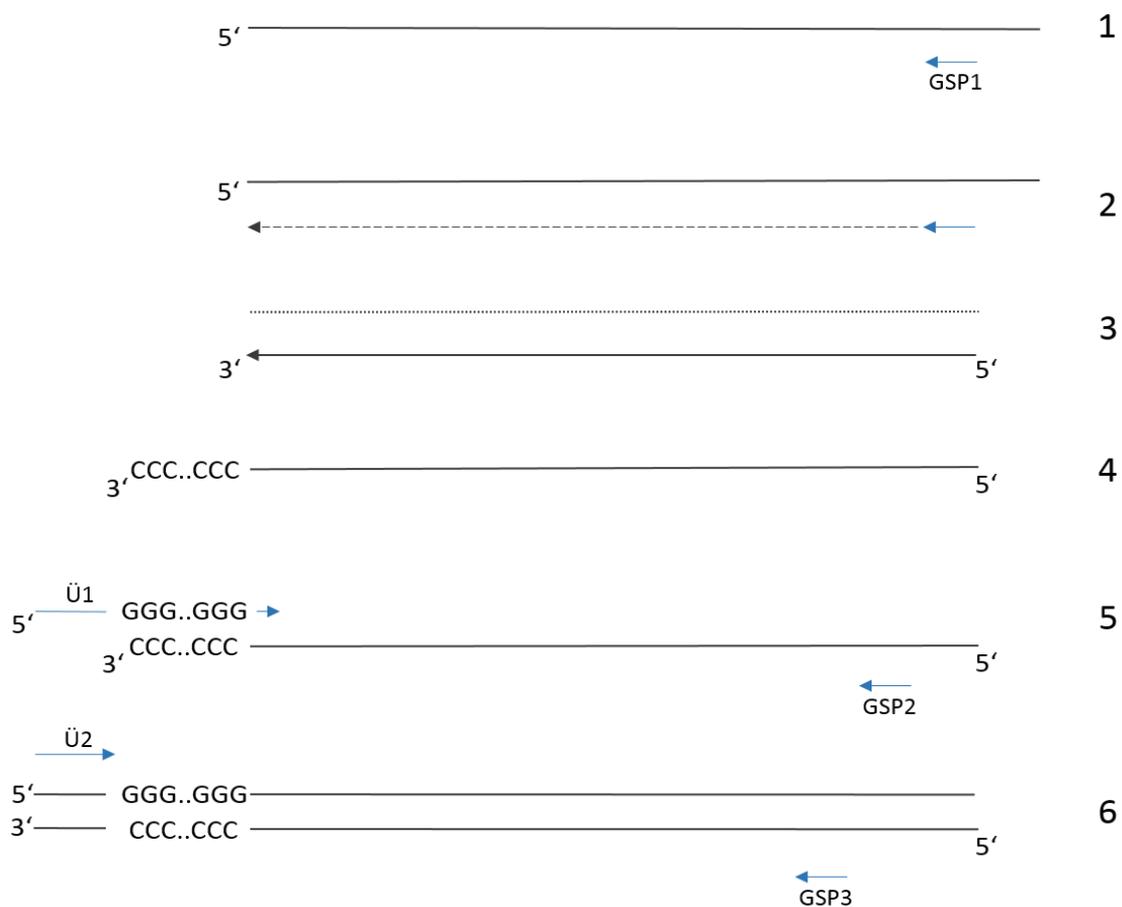


Abbildung 2.2: 5' RACE PCR.

Die 5' RACE PCR kann Aufschluss über die genaue Basenabfolge des 5' Endes einer cDNA geben. (1) Ausgehend von der mRNA wird ein genspezifischer Primer (GSP1) verwendet, der ans 3' Ende der mRNA bindet. (2) Durch reverse Transkription wird mit Hilfe von GSP1 die komplementäre cDNA synthetisiert. (3) Ein Gemisch aus RNaseH und RNaseT1 baut RNA-Moleküle von RNA-DNA-Heteroduplexen und einzelsträngige RNA ab. (4) Die terminale Desoxyribonukleotidtransferase fügt ans 3' Ende der cDNA einen Poly-C-Schwanz an. (5) Dieser Poly-C-Schwanz dient als Anlagerung für den Primer Ü1, einem Oligo-dG Primer mit Überhang, der zusammen mit einem weiteren genspezifischen Primer (GSP2) in einer PCR-Reaktion verwendet wird. (6) Zur Erhöhung der Spezifität des PCR Produkts wird anschließend eine nested PCR durchgeführt mit einem Primer (Ü2), der sich spezifisch an den Überhang anlagert und einem weiteren genspezifischen Primer (GSP3), der im Vergleich zu GSP2 und GSP1 weiter innerhalb der Sequenz liegt. Das erhaltene Produkt wird sequenziert.

(GSP2) und einem Oligo-dG Primer mit Überhang (Ü1) durchgeführt. Um die Spezifität des PCR-Produkts zu erhöhen, wurde im Anschluss eine nested PCR durchgeführt, mit einem im Vergleich zum GSP2 weiter innenliegenden Primer (GSP3) und einem Primer, der spezifisch an den angefügten Überhang bindet (Ü2). Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt und sequenziert (Abschnitte 2.2.14 und 2.2.18).

2.2.13 Agarose-Gelelektrophorese

Ethidiumbromid-Gele

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Nukleinsäuren wandern dabei im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und werden ihrer Größe nach aufgetrennt. Kleinere Fragmente durchlaufen das Gel dabei schneller als größere Fragmente. Zur Anfärbung der DNA wurde der Farbstoff Ethidiumbromid verwendet, der in die DNA interkaliert und durch UV-Strahlung angeregt werden kann. Als Größenstandard wurde ein DNA-Marker verwendet.

Kristallviolett-Gele

Zur Isolierung spezifischer von unspezifischen DNA-Banden für Klonierungen wurde ein 0,8 % Kristallviolett-Gel verwendet. Der in die DNA interkalierende Kristallviolettfarbstoff ist bei natürlichem Licht bereits mit bloßem Auge sichtbar und muss nicht mittels UV-Strahlung angeregt werden. Durch die Anregung mit UV-Strahlung könnten UV-Schäden entstehen, die die Sequenz des DNA-Fragmentes verändern können. Um dies zu verhindern, wurden die Proben auf ein Kristallviolett-Gel aufgetragen, die spezifische Bande ausgeschnitten und mit Hilfe des High Pure PCR Purification Kits aufgereinigt (Abschnitt 2.2.14).

2.2.14 Aufreinigung eines PCR-Produkts

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das High Pure PCR Purification Kit von Roche verwendet und nach Angaben des Herstellers mit folgenden Abweichungen durchgeführt: Die Dauer der Zentrifugationsschritte betrug jedes Mal 1 min. Zum Entfernen von möglichen Ethanolresten nach erfolgtem Waschen wurde das Reaktionsgefäß für 1 min trocken zentrifugiert. Anstelle des Elutionspuffers wurde zum Eluieren ddH₂O verwendet.

2.2.15 Gelaufreinigung

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die aus einem Kristallviolett-Gel ausgeschnitten wurden, wurde ebenfalls das High Pure PCR Purification Kit von Peqlab verwendet. Mit Ausnahme des Trockenzentrifugierens für 1 min zum Entfernen von Ethanolresten nach dem Waschschrift wurde die Aufreinigung nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anstelle des Elutionspuffers wurde ddH₂O verwendet.

2.2.16 Restriktionsverdau von Plasmiden

Zur Linearisierung des pSBO-2 Vektors für Klonierungen und zur Kontrolle, ob der Vektor das gewünschte Insert aufgenommen hatte, wurden Verdaureaktionen mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Jeder Restriktionsverdau wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt und für 3-4 Stunden oder über Nacht beim Temperaturoptimum des Enzyms inkubiert. Zur anschließenden Kontrolle des Verdauvorgangs wurde ein Teil des Reaktionsansatzes auf einem Ethidiumbromid-Gel aufgetrennt und die entstandenen Fragmente überprüft.

2.2.17 In-Fusion Klonierung

Für die verschiedenen Klonierungen wurde das In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit von der Firma Clontech verwendet. Die Methode basiert auf der Verknüpfung von freien DNA-Enden, die einen 15 bp langen, homologen Bereich aufweisen. Dabei erkennt die In-Fusion Polymerase diese 15 bp langen Überhänge und verursacht einzelsträngige Enden am Vektor und Insert, wodurch diese beiden Moleküle aufgrund ihrer Homologie zusammengefügt werden. Die jeweils 15 bp langen homologen Überhänge wurden mittels spezifischer Überhangsprimer an das Insert angefügt. Zum Primerdesign wurde dafür das In-Fusion Primer Onlinetool der Firma Clontech verwendet. Die Durchführung der In-Fusion Methode erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.18 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Klonierung, sowie zur genauen Bestimmung des T-DNA Insertionsorts, wurden die Proben von der Firma GATC Biotech sequenziert. Die Konzentrationsanforderung für Plasmide betrug 30 – 100 ng/μl, wohingegen die Konzentration von PCR-Fragmenten zwischen 10 – 50 ng/μl liegen sollte. Mitgeschickte Primer sollten eine Konzentration von 10 pmol/μl aufweisen. Die fertigen

Sequenzdaten konnten von der Homepage heruntergeladen werden und wurden mit den Programmen Finch TV, DNA-Star MegAlign und SeqMan ausgewertet.

2.2.19 RNA-Extraktion

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels dem RNeasy RNA Plant Mini Kit aus zwei Wochen alten Pflanzen. Hierfür wurde 100 mg Pflanzenmaterial in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß abgewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der für die Extraktion eingesetzte RLT-Puffer wurde vor Verwendung mit 10 µl pro ml Puffer Thioglycerin versetzt. Alle weiteren Schritte der RNA-Extraktion erfolgten nach Angaben des Herstellers. Der optionale DNA-Verdau mit DNaseI wurde bei jeder Extraktion durchgeführt. Die Konzentration der extrahierten RNA wurde mit Hilfe des Qubit RNA Broad Range Kits bestimmt.

2.2.20 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese wurde mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Für jede Reaktion wurden 5 µg der zuvor extrahierten RNA (Abschnitt 2.2.19) eingesetzt. Für Genexpressionsanalysen wurden Oligo-dT Primer verwendet, wohingegen für die Überprüfung der Expression des Rekombinationsreportergens *GUS* der *GUS* Gen spezifische Primer IC9C-FH-RT und zusätzlich der Primer Actin2-RT-rev für die Synthese des Haushaltgens *ACTIN2* eingesetzt wurden. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Vor Verwendung der cDNA wurde der 20 µl Ansatz mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt.

2.2.21 Qualitätskontrolle der cDNA

Um die synthetisierte cDNA auf eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA zu überprüfen, wurde eine PCR mit spezifischen Primern für das *β-Tubulin* Gen durchgeführt. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass sich zwischen den Bindestellen der beiden Primer zwei Introns befinden. Aufgrund dieser Introns würden Kontaminationen mit genomischer DNA zu einem größeren Produkt führen als bei cDNA, in der keine Reste von genomischer DNA zu finden sind. Die PCR-Reaktionen wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen und ausgewertet. Zur Kontrolle wurde eine PCR-Reaktion mit genomischer DNA als Matrize verwendet.

2.2.22 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR Methode wurde zur Bestimmung der Genexpression verwendet. Die Analysen wurden mit dem Light Cycler 480 und der Software des Herstellers durchgeführt. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass ein Produkt von etwa 200 bp Länge entsteht. Für einen Reaktionsansatz von 7 µl wurden 5 µl SYBR Green Mix, 0,075 µl der beiden Primer, 1,5 µl ddH₂O und 3 µl cDNA verwendet. Alle Proben wurden in Form von Triplikaten angesetzt. Aufgrund der eingesetzten Hotstart-Polymerase des SYBR Green Mix erfolgten die Aktivierung der Polymerase und die Denaturierung der DNA für 5 min bei 95 °C. Nach 50 Amplifikationszyklen (10 s 95 °C, 20 s 55 °C, 40 s 72 °C) wurde eine Schmelzkurve erstellt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen *ACTIN2* (At3g18780) verwendet.

Mikrobiologische Arbeiten

2.2.23 Transformation von *E. coli*

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden diese in den chemokompetenten *E. coli* Stamm NEB5α transformiert. Hierfür wurden pro Ansatz 100 µl Bakterienzellen vollständig auf Eis aufgetaut (Lagerung bei -80 °C) und je 5 µl In-Fusion Ligationsansatz hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen der Probe wurde diese für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C ausgesetzt. Die Bakterienlösung wurde für 2 min auf Eis abgekühlt, bevor pro Ansatz 500 µl auf 37 °C vorgewärmtes, flüssiges LB-Medium dazugegeben wurde. Zur Expression des jeweiligen Resistenzgens wurde die Lösung für 1 h bei 37 °C und 500 UPM inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl des Transformationsansatzes auf Spectinomycin-haltigen LB-Platten ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, waren aufgrund des enthaltenen Resistenzgens in der Lage, auf dem Selektionsmedium zu wachsen.

2.2.24 Übernachtskultur und Plasmidisolierung

Zur Isolierung der Plasmide aus den Bakterienzellen wurde eine Übernachtskultur angesetzt. Hierfür wurden 5 ml Spectinomycin-haltiges, flüssiges LB-Medium mit je einer auf dem Selektionsmedium gewachsenen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 UPM inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Plasmid mit Hilfe des Plasmid Miniprep Kits von Peqlab nach Angaben des Herstellers isoliert, bevor das Plasmid in Agrobakterien transformiert wurde.

2.2.25 Transformation von *A. tumefaciens*

Für die Transformation des Plasmids in Agrobakterien wurde der elektrokompetente Stamm GV3101::pMP90 verwendet. Pro Ansatz wurden 100 µl Agrobakterienlösung auf Eis aufgetaut (Lagerung bei -80 °C) und 1 µl des isolierten Plasmids hinzu pipettiert, bevor das Gemisch vollständig in eine Küvette überführt wurde. Die Transformation erfolgte in einem Elektroporator (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω, 5 ms). Anschließend wurden pro Ansatz 500 µl flüssiges YEB-Medium zugegeben und für 1 h bei 28 °C und 500 UPM inkubiert. Je 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer Antibiotika-haltigen Platte (mit Rifampicin, Gentamycin, Spectinomycin) ausgebracht und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation von *MHF1* in *Arabidopsis thaliana*

Der Fanconi Anämie-Signalweg im Menschen ist ein essentieller Reparaturmechanismus zur Beseitigung von Interstrang-*Crosslinks* innerhalb der DNA. FANCM dient dabei als Sensor für blockierte Replikationsgabeln, die durch Interstrang-CLs ausgelöst werden. Dabei erkennt FANCM den Schaden und bindet an ihn, wodurch der FA-Signalweg aktiviert wird. Für diese Bindung sind allerdings zwei weitere Fanconi Anämie-assoziierte Proteine von Bedeutung, die als MHF1 und MHF2 bezeichnet werden und zusammen den MHF-Komplex bilden. Dieser Komplex ist in die korrekte Bindung von FANCM an den DNA-Schaden involviert. Ein Fehlen des MHF-Komplexes, durch Ausfall eines der MHF Proteine, resultiert in einer verminderten Aktivierung des FA-Signalwegs und einer erhöhten Sensitivität der betroffenen Zellen gegenüber Interstrang-CL induzierenden Agenzien. Ebenso wie sein Interaktionspartner FANCM liegen auch MHF1 und MHF2 konserviert in Eukaryoten vor. In Hefe wurde nachgewiesen, dass für diese Proteine defiziente Hefezellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem methylierenden Agens Methylmethansulfonat aufweisen, was auf eine Funktion von Mph1 und Mhf in der Reparatur dieser Schadensart schließen lässt. In *Arabidopsis thaliana* wurde bereits ein Homolog von FANCM untersucht (Knoll *et al.*, 2012). Für AtFANCM wurde gezeigt, dass es wahrscheinlich nicht in die Reparatur von Interstrang-CLs involviert ist, da *Atfancm* Mutanten keine erhöhte Sensitivität gegenüber dieser Schadensart zeigen (Knoll *et al.*, 2012). Allerdings konnte eine Funktion von FANCM in der Unterdrückung von somatischen homologen Rekombinationsereignissen und in der Regulation der Meiose nachgewiesen werden. Die Funktionen von MHF1 in *Arabidopsis* wurden bisher noch nicht beschrieben, weshalb im Rahmen dieser Arbeit AtMHF1 näher untersucht werden sollte.

In *Arabidopsis thaliana* konnte durch BLAST Analysen ein Homolog zum menschlichen MHF1 gefunden werden. *AtMHF1* befindet sich auf dem Locus At5g50930 auf Chromosom 5. Der Vergleich der für AtMHF1 vorhergesagten Aminosäuresequenz mit den Sequenzen der tierischen Homologe ergab, dass das pflanzliche Homolog einen längeren N-Terminus aufwies, der in den tierischen Homologen nicht konserviert vorlag. Ausführliche Untersuchungen ergaben, dass die genomische Sequenz von *AtMHF1* und die Transkriptsequenz, die in Onlinedatenbanken (in TAIR; *The Arabidopsis Information Resource*, At5g50930, accession number 4515117436) zu finden sind, insgesamt vier mögliche Startcodons enthalten, wobei das am meisten 5' gelegene als Start der Translation gewählt wurde. Um zu untersuchen, welches dieser möglichen Startcodons das richtige darstellt, wurde mittels einer 5' RACE PCR (*rapid amplification of cDNA ends*) das 5'-Ende der MHF1 cDNA kloniert und durch Sequenzierung dessen genaue Basenabfolge ermittelt. Dies ergab schließlich, dass im Gegensatz

Im angrenzenden 5'-Bereich der T-DNA kam es zu einer 18 bp langen Deletion der genomischen Sequenz und zu einer 8 bp langen Insertion einer fremden DNA-Sequenz. 3' der T-DNA kam es ebenfalls zu einer Insertion von Fremd-DNA von 5 bp Länge. Die T-DNA weist in beiden, zum Gen hin orientierten *left border* Sequenzen Deletionen von 102 bp beziehungsweise 78 bp auf (Abbildung 3.2 B). Der Integrationsort der T-DNA in der *mhf1-2* Mutante liegt vor Exon 1 im 5' UTR-Bereich. Im Gegensatz zu *mhf1-1* konnte bei *mhf1-2* allerdings nur der angrenzende 3'-Bereich der T-DNA bestimmt werden. Die *left border* Sequenz weist eine Deletion von 262 bp Länge auf. Im angrenzenden genomischen Bereich kam es durch die T-DNA Integration zu einer 11 bp langen Insertion von Fremd-DNA.

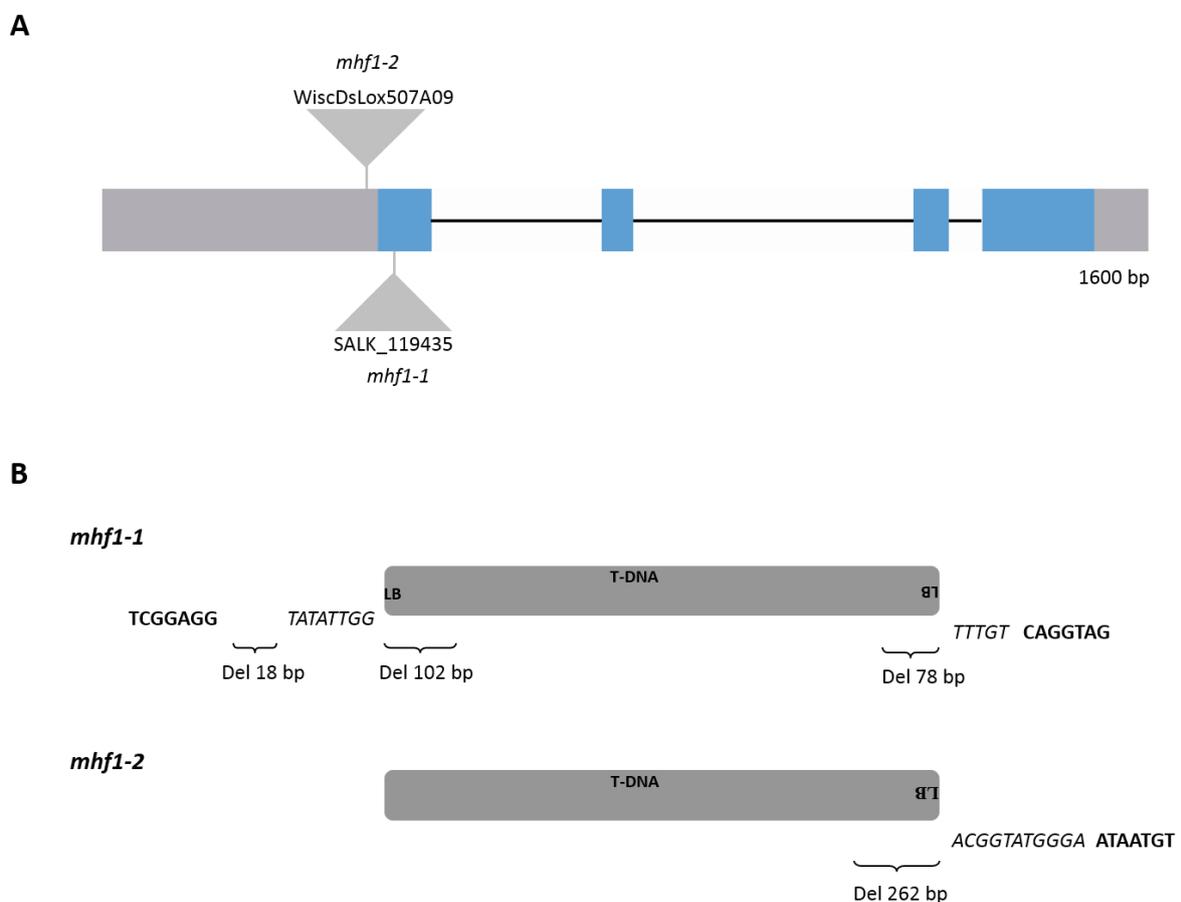


Abbildung 3.2: Charakterisierung des Insertionsbereich der *AtMHF1* Mutanten *mhf1-1* und *mhf1-2*.

(A) Die genomische Struktur von *AtMHF1* setzt sich aus vier Exons (blau) und drei Introns (schwarze Linie) mit einer Gesamtlänge vom Start- bis Stopcodon von 1600 bp zusammen. Der Integrationsort der Mutanten *mhf1-1* (SALK_119435) und *mhf1-2* (WiscDsLox507A09) befindet sich in Exon 1 (*mhf1-1*) beziehungsweise im 5' UTR-Bereich (*mhf1-2*). Die UTR-Bereiche sind in grau abgebildet. (B) Eine detaillierte Analyse der T-DNA Insertionsmutanten *mhf1-1* und *mhf1-2* ergab, dass in beiden Fällen eine Mehrfachinsertion der T-DNA vorliegt. Die genomische Sequenz ist in fett dargestellt. Insertionen von Fremd-DNA, die durch die Integration der T-DNA entstanden sind, wurden kursiv abgebildet. Kam es zu Deletionen von genomischer oder *left border* (LB) Sequenzen, so wurde dies mit Del abgekürzt und die genaue Länge angegeben.

Um den Einfluss einer T-DNA Insertion auf die Transkription/Expression eines Gens in Mutantenlinien zu überprüfen, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Trotz der T-DNA Insertion kann nicht ausgeschlossen werden, dass Bereiche des betroffenen Gens oder sogar das komplette Gen abgelesen werden. Befindet sich die T-DNA Insertion in einem Intronbereich, könnte diese während des Spleißvorgangs entfernt und das Gen vollständig transkribiert werden. Liegt der Integrationsort der T-DNA in einem Exon, könnten immer noch Teile des Gens exprimiert werden. Der Bereich vom Startcodon bis zur Insertion oder der Bereich nach der T-DNA Integration könnten zu Teiltranskripten und damit auch zu Teilproteinen führen. Um dies zu überprüfen, wurden Expressionsanalysen der *MHF1* Mutanten *mhfl-1* und *mhfl-2* durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die Gesamt-RNA aus den Mutanten- und zum Vergleich aus Wildtyppflanzen extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von *MHF1* in den beiden Mutanten wurde schließlich mittels quantitativer Real-time PCR bestimmt. Die Analyse erfolgte mit zwei verschiedenen Primerkombinationen die in der Lage waren je ein Produkt über oder 3' der T-DNA Insertion zu bilden. Das Expressionslevel 5' der T-DNA Insertion konnte in den Mutanten nicht bestimmt werden, da die Transkriptlänge 5' der T-DNA in beiden Fällen nur wenige Nukleotide betrug. Zur Normalisierung wurde die Expression des Haushaltgens *ACTIN2* verwendet. Eine Liste der verwendeten Primer ist im Anhang in Tabelle 8.3 aufgelistet. Die Expression über die T-DNA lieferte keine (für *mhfl-1*) oder nur eine sehr geringe Restexpression (für *mhfl-2*) des Gens im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.3). 3' der T-DNA wurde in *mhfl-1* Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp sechsfach erhöhte Expression von *MHF1* gemessen, wohingegen die Expression in *mhfl-2* Mutanten vergleichbar mit der des Wildtyps war. Aufgrund dieser Expression 3' der T-DNA sind *mhfl-1* und *mhfl-2* keine Nullmutanten. Die Expression 3' der T-DNA könnte demnach zu Teilproteinen führen.

3.1.2 Die Funktion von AtMHF1 in der DNA Reparatur

Wie bereits weiter oben beschrieben, wird MHF1 in Säugern eine Funktion in der Reparatur von Interstrang-CLs zugeschrieben. In Hefe ist Mhf1 in die Reparatur MMS-induzierter Schäden involviert. Um zu überprüfen, ob MHF1 in Arabidopsis ebenfalls an der Reparatur von DNA Schäden beteiligt ist, wurde die Sensitivität der beiden Mutanten *mhfl-1* und *mhfl-2* gegenüber verschiedenen Genotoxinen, insbesondere den CL-induzierenden Agenzien *cis*-Platin und MMC untersucht. Hierfür wurden eine Woche alte Pflanzen mit den unterschiedlichen Genotoxinen behandelt und nach zwei Wochen Inkubation das Frischgewicht bestimmt. Zeigt eine Mutante ein im Vergleich zum Wildtyp vermindertes Wachstum und damit auch ein reduziertes Frischgewicht auf, so ist das Gen, welches in der Mutante ausgeschaltet ist, wahrscheinlich in die Reparatur des Schadens involviert.

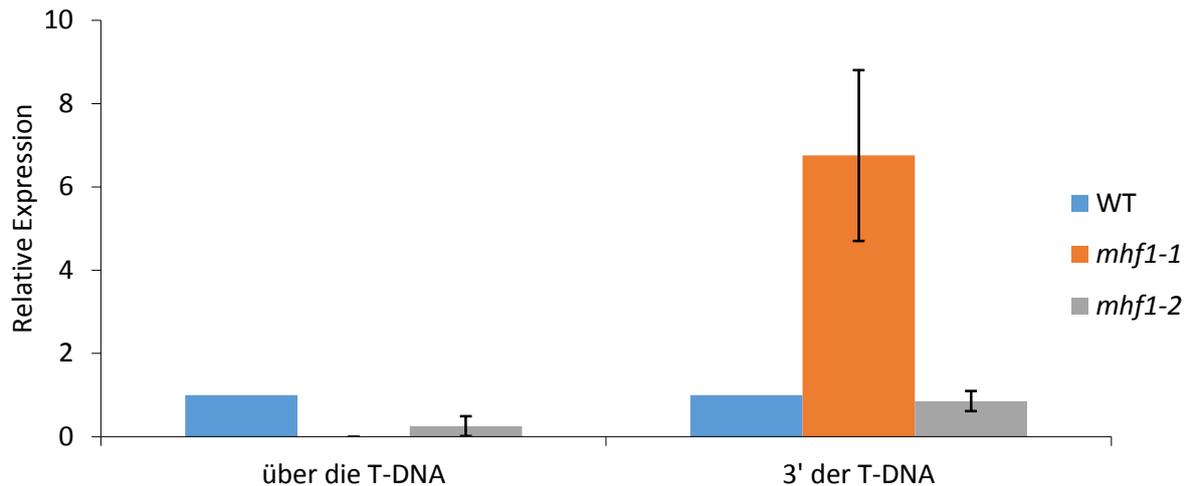


Abbildung 3.3: Bestimmung des Expressionsniveaus von *MHF1* in *mhf1-1* und *mhf1-2*.

Die Expression von *MHF1* in den Mutantenlinien *mhf1-1* und *mhf1-2* wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Primerkombinationen bestimmt, die die T-DNA flankieren oder ein Produkt 3' der T-DNA Insertion liefern konnten. 5' des T-DNA Integrationsorts konnte die Expression in beiden Mutante nicht getestet werden, da sich in beiden Fällen 5' der Insertion nur wenige Nukleotide befanden. Über die T-DNA ist in *mhf1-1* keine und in *mhf1-2* nur eine sehr geringe Restexpression von *MHF1* im Vergleich zum Wildtyp auszumachen. 3' der T-DNA Insertion konnte in *mhf1-1* eine sechsfach erhöhte und in *mhf1-2* Mutanten eine zum Wildtyp vergleichbare Expression gemessen werden.

Im Gegensatz zu *MHF1* in anderen Organismen, konnte sowohl in der *mhf1-1*, als auch in der *mhf1-2* Mutante keine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Sensitivität gegenüber den getesteten Genotoxinen Bleomycin, Methylmethansulfonat, Hydroxyurea und Camptotecin detektiert werden. Auch insbesondere nicht gegenüber dem Intrastrang-CL induzierenden *cis*-Platin (vgl. Anhang Tabelle 8.6-8.11 und Abbildungen 8.1-8.5) und gegenüber MMC (Abbildung 3.4), welches zu Interstrang-CLs in der DNA führt und für das eine Hypersensitivität von *MHF1*-mutierten Zellen im Menschen gezeigt werden konnte.

In *Arabidopsis thaliana* konnte bereits gezeigt werden, dass die Reparatur von DNA-Quervernetzungen hauptsächlich von den Proteinen *RECQ4A*, *MUS81* und *RAD5A* durchgeführt wird und diese dabei in drei verschiedenen Signalwegen agieren (Mannuss *et al.*, 2010). Obwohl keine der beiden *mhf1* Einzelmutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMC aufwies, wurden Doppelmutanten von *mhf1* mit den Mutanten der Gene *RECQ4A*, *MUS81* und *RAD5A* generiert und homozygot etabliert. Falls *MHF1* in *Arabidopsis* nur eine verminderte Funktion in der CL-Reparatur übernimmt, könnte der Ausfall eines wichtigen CL-Reparaturgens diese Funktion möglicherweise aufdecken. Da im Menschen *MHF1* direkt mit *FANCM* interagiert wurde zudem auch eine Doppelmutante von *mhf1* mit *fancm* generiert und analysiert. Weiterhin konnte in *Arabidopsis thaliana* noch ein weiteres *FANC*-Gen, *FANCJB*, charakterisiert werden, welches ähnlich wie im Menschen auch an der Reparatur von Interstrang-CLs beteiligt ist (Köhler, 2014). Aus diesem Grund wurde ebenfalls eine Doppelmutante aus *mhf1* und *fancjb* hergestellt und untersucht.

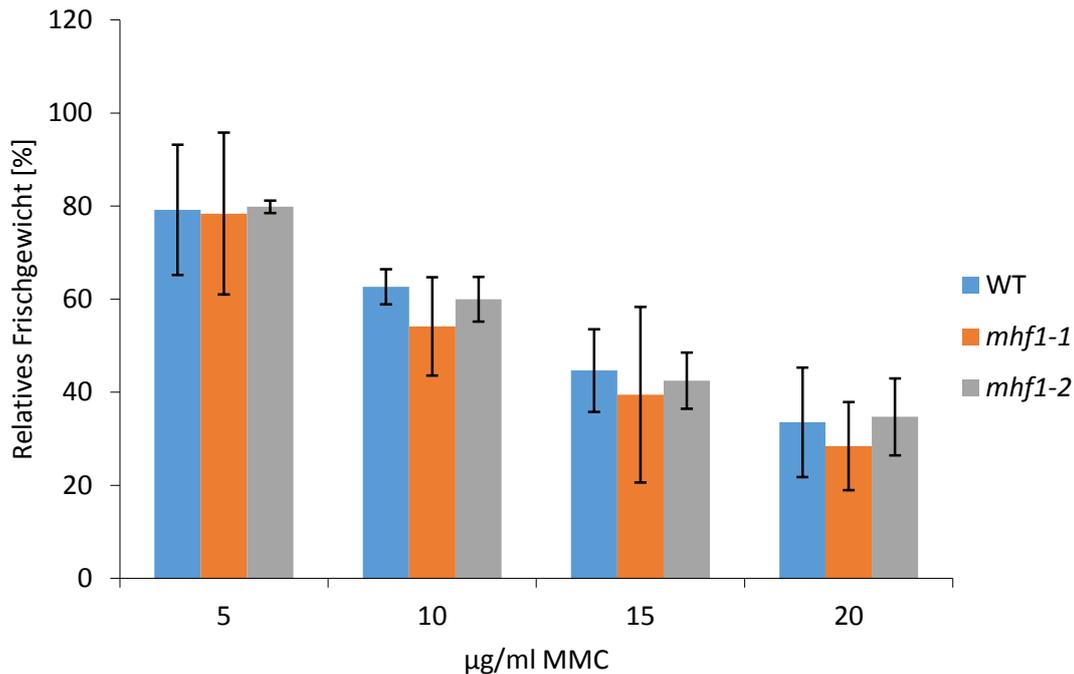


Abbildung 3.4: Relatives Frischgewicht von *mhfl-1* und *mhfl-2* gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Mutantenlinien *mhfl-1* und *mhfl-2*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Nach Induktion von DNA-Schäden durch MMC ist keine erhöhte Sensitivität von *mhfl-1* und *mhfl-2* im Vergleich zum Wildtyp auszumachen. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

RECQ4A ist eine der insgesamt sieben RecQ-Helikasen in *Arabidopsis thaliana*, die in für die Zelle essentielle Prozesse wie DNA-Reparatur, -Rekombination und -Replikation involviert sind. Für AtRECQ4A konnte gezeigt werden, dass es in die Reparatur von Intrastrang-CLs und in die Reparatur MMS-induzierter Schäden involviert ist (Hartung *et al.*, 2007). Eine Funktion in der Reparatur von Interstrang-CLs konnte für AtRECQ4A bisher nicht nachgewiesen werden. Zur Überprüfung, ob die Doppelmutante von *mhfl-1* und *recq4A-4* eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMC aufweist, wurden die Doppelmutante, die beiden Einzelmutanten und der Wildtyp für zwei Wochen in verschiedenen MMC-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde das Gewicht der getesteten Pflanzen bestimmt und das relative Frischgewicht anhand der unbehandelten Kontrolle berechnet. Der Mittelwert des relativen Frischgewichts wurde in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.5). Die relativen Frischgewichte der beiden Einzelmutanten *mhfl-1* und *recq4A-4* waren bei allen getesteten Konzentrationen vergleichbar mit dem des Wildtyps und betrugen zwischen 80 und 30 %. Die Doppelmutante *mhfl-1 recq4A-4* zeigte bei den Konzentrationen 10 und 15 µg/ml eine signifikant erhöhte Sensitivität im Vergleich zu beiden Einzelmutanten und dem Wildtyp. Das relative Frischgewicht des Wildtyps und der Einzelmutanten betrug in beiden Konzentrationen etwa 60 beziehungsweise 50 %, wohingegen das der Doppelmutante zwischen 30 und 20 % lag.

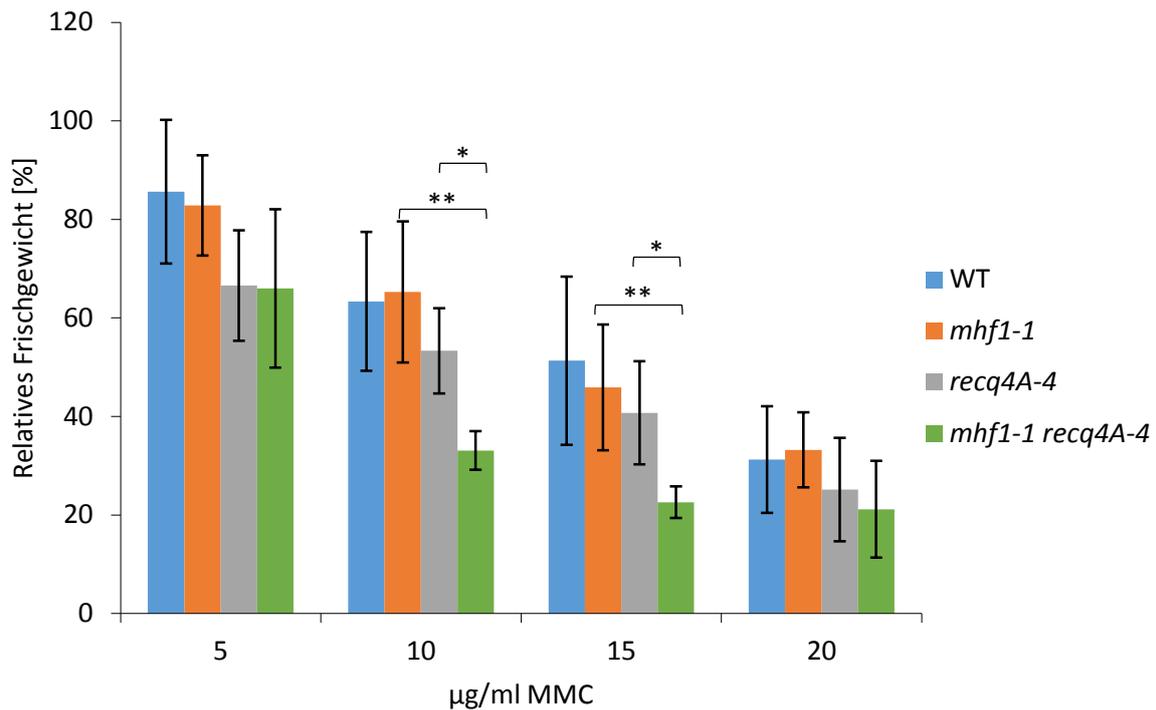


Abbildung 3.5: Relatives Frischgewicht der *mhfl-1 recq4A-4* Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutanten *mhfl-1*, *recq4A-4*, die Doppelmutante *mhfl-1 recq4A-4*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Die Konzentrationen 10 und 15 µg/ml MMC führten zu einer signifikant höheren Sensitivität von *mhfl-1 recq4A-4* im Vergleich zu beiden Einzelmutanten und dem Wildtyp. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*); p-Wert $< 0,01$ (**).

MUS81 bildet zusammen mit seinem Interaktionspartner EME1 einen Nukleasekomplex, der in die Auflösung verschiedener DNA-Intermediate wie etwa blockierten Replikationsgabeln, D-loops und *Holliday Junctions* involviert ist (Boddy *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Kaliraman *et al.*, 2001). In *Arabidopsis thaliana* wurde nachgewiesen, dass der Ausfall von *MUS81* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber *cis*-Platin, MMC und MMS führt (Hartung *et al.*, 2006). Zur Überprüfung der Sensitivität der Doppelmutante *mhfl-1 mus81-1* wurde diese, sowie die dazugehörigen Einzelmutanten und der Wildtyp mit verschiedenen Konzentrationen von MMC behandelt und für zwei Wochen inkubiert, bevor das Frischgewicht der Pflanzen bestimmt wurde. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Der Mittelwert des relativen Frischgewichts wurde in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.6). Die *mhfl-1* Einzelmutante besaß ein zum Wildtyp vergleichbares relatives Frischgewicht, das sich bei den getesteten Konzentrationen zwischen 80 und 40 % befand. Die *mus81-1* Einzelmutante wies, wie bereits gezeigt werden konnte,

eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMC auf, was in einem verminderten relativen Frischgewicht im Vergleich zum Wildtyp von 50 bis nur noch 20 % der unbehandelten Kontrolle bei den getesteten Konzentrationen resultierte. Die *mhf1-1 mus81-1* Doppelmutante besaß ein im Vergleich zu *mus81-1* vergleichbares und nicht signifikant verschiedenes relatives Frischgewicht.

RAD5A ist eine ATPase, die zur SNF2-Familie gezählt wird und in Hefe (als Rad5) in die PRR involviert ist. RAD5A in Arabidopsis ist ebenfalls in die DNA-Reparatur involviert, da *rad5A* Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber *cis*-Platin, MMC und MMS zeigen. Bezüglich der Reparatur von Interstrang-CLs, induziert durch MMC, konnte nachgewiesen werden, dass RAD5A dabei in einem parallelen Signalweg Nuklease MUS81 agiert (Mannuss *et al.*, 2010). Da bereits die Untersuchung der *mhf1-1 recq4A-4* Doppelmutante zu einer erhöhten Sensitivität führte, wurde auch die Doppelmutante aus *mhf1-1* und *rad5A-2* generiert und auf ihre Sensitivität gegenüber MMC überprüft. Hierfür wurden die Doppelmutante, die beiden Einzelmutanten und der Wildtyp für zwei Wochen in verschiedenen MMC-Konzentrationen inkubiert und schließlich das relative Frischgewicht bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle berechnet. Die Mittelwerte der relativen Frischgewichte wurden in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.7). Wie zu erwarten,

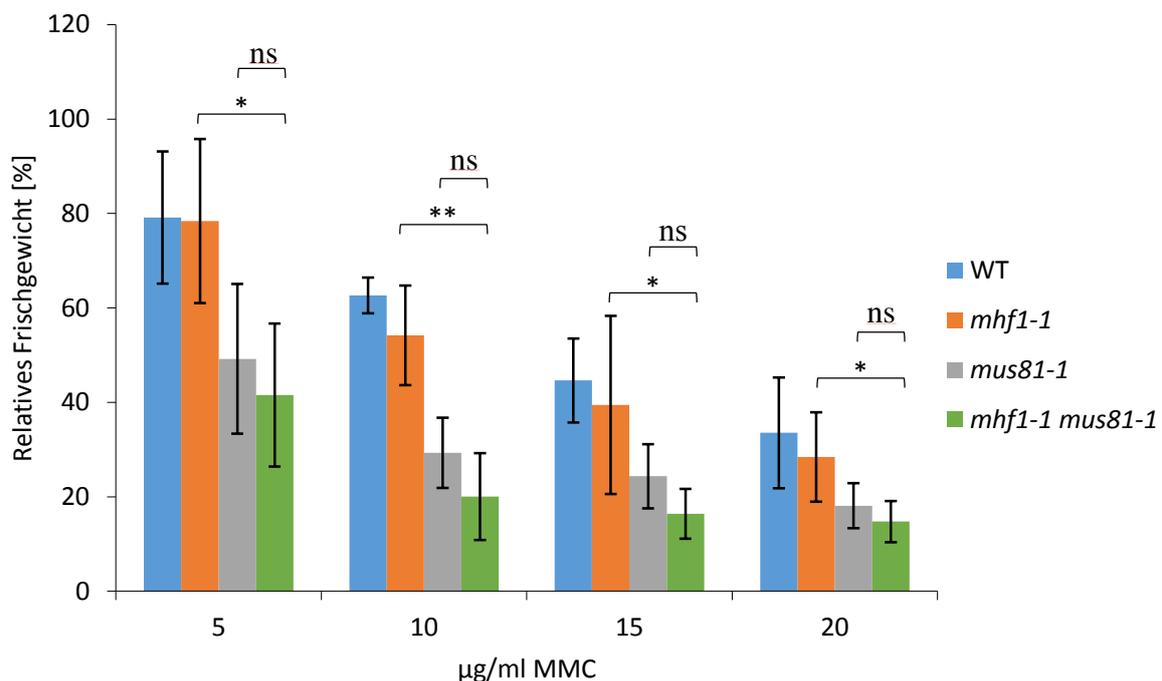


Abbildung 3.6: Relatives Frischgewicht der *mhf1-1 mus81-1* Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutanten *mhf1-1*, *mus81-1*, die Doppelmutante *mhf1-1 mus81-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. In allen getesteten Konzentrationen zeigte *mhf1-1 mus81-1* ein vergleichbares und nicht signifikant verschiedenes relatives Frischgewicht wie die *mus81-1* Einzelmutante. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*); p-Wert $< 0,01$ (**). ns = nicht signifikant.

war das relative Frischgewicht der *mhf1-1* Einzelmutante vergleichbar zum relativen Frischgewicht des Wildtyps, das bei den getesteten Konzentrationen zwischen 90 und 40 % lag. *rad5A-2* hingegen zeigte bereits bei 5 µg/ml ein deutlich vermindertes Frischgewicht von nur noch 30 % der unbehandelten Kontrolle auf. Bei 10 bis 15 µg/ml betrug das relative Frischgewicht zwischen 25 und 15 %. Die Doppelmutante *mhf1-1 rad5A-2* wies ein zur *rad5A-2* Einzelmutante vergleichbares und nicht signifikant verschiedenes relatives Frischgewicht auf.

MHF1 bildet im Menschen zusammen mit MHF2 einen Komplex, der mit FANCM interagiert und dadurch die korrekte Bindung von FANCM an den DNA-Schaden vermittelt. Für die *fancm-1* Einzelmutante konnte, wie auch für *mhf1*, keine erhöhte Sensitivität gegenüber MMC beobachtet werden (Knoll *et al.*, 2012). Aufgrund der Tatsache, dass MHF1 und FANCM im Menschen zusammen agieren, wurde auch die *mhf1-1 fancm-1* Doppelmutante auf ihre Sensitivität gegenüber MMC untersucht. Hierfür wurden die zu testenden Pflanzen für zwei Wochen in verschiedenen MMC-Konzentrationen inkubiert und anschließend das Frischgewicht bestimmt. Das relative

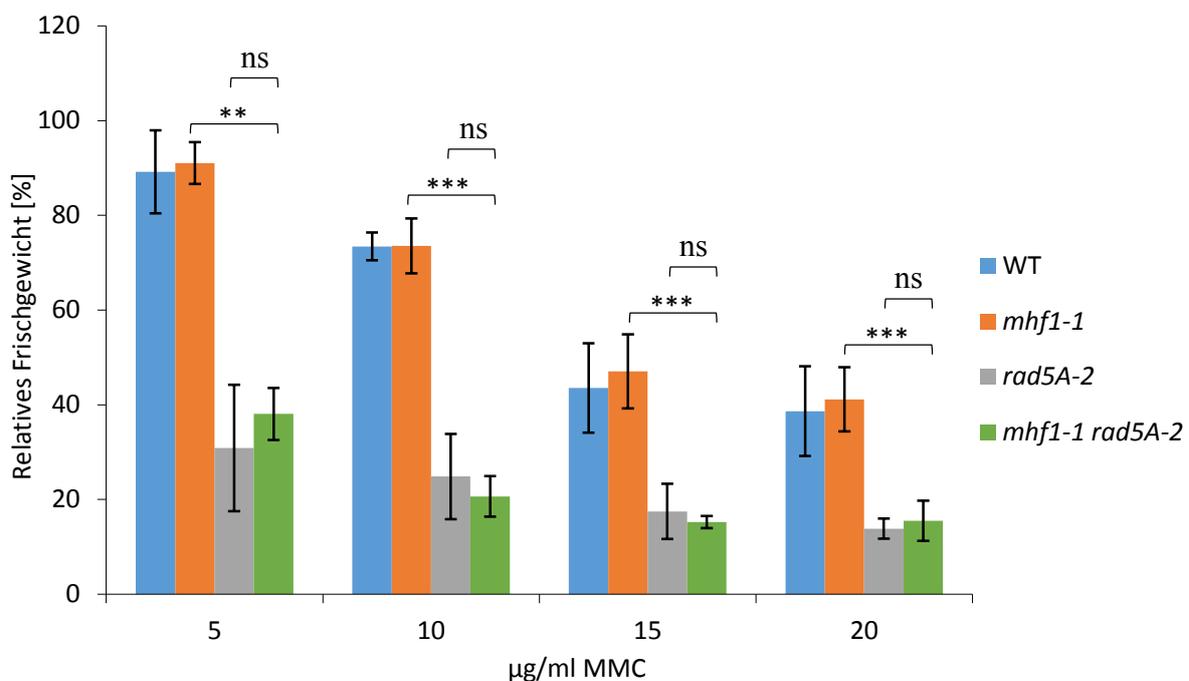


Abbildung 3.7: Relatives Frischgewicht der *mhf1-1 rad5A-2* Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutanten *mhf1-1*, *rad5A-2*, die Doppelmutante *mhf1-1 rad5A-2*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. In allen getesteten Konzentrationen zeigte *mhf1-1 rad5A-2* ein vergleichbares und nicht signifikant verschiedenes relatives Frischgewicht wie die *rad5A-2* Einzelmutante auf. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert < 0,01 (**); p-Wert < 0,001 (***). ns = nicht signifikant.

Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle berechnet. Der Mittelwert des relativen Frischgewichts und die Standardabweichung wurden bestimmt und in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.8). Der Wildtyp, beide Einzelmutanten und die Doppelmutante *mhf1-1 fancm-1* zeigten in allen getesteten Konzentrationen ein vergleichbares relatives Frischgewicht zwischen etwa 90 und 40 %.

FANCI stellt eines der *FANCI*-Gene dar, die im Menschen zusammen innerhalb des Fanconi Anämie-Signalwegs zur Reparatur von Interstrang-CLs agieren. Wie bereits in Abschnitt 1.4.3 beschrieben, sind in *Arabidopsis thaliana* zwei Homologe zu *FANCI* zu finden, die als *FANCI*A und *FANCI*B bezeichnet wurden. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass AtFANCIJB ebenfalls in die Reparatur von Interstrang-CLs involviert ist und dabei epistatisch zu AtRECQ4A und AtRAD5A agiert. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass AtFANCIJB in einem parallelen Signalweg zu AtMUS81 agiert (Köhler, 2014). Um zu überprüfen, ob MHF1 in Arabidopsis, ähnlich wie die Situation im Menschen, in einem gemeinsamen Signalweg mit FANCIJB agiert, wurde die Doppelmutante aus *mhf1-1* und *fancjb-1* generiert und auf ihre Sensitivität bezüglich Interstrang-CLs überprüft. Hierfür wurden die Doppelmutante, beide Einzelmutanten und der Wildtyp für zwei Wochen in MMC inkubiert und das Frischgewicht bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle

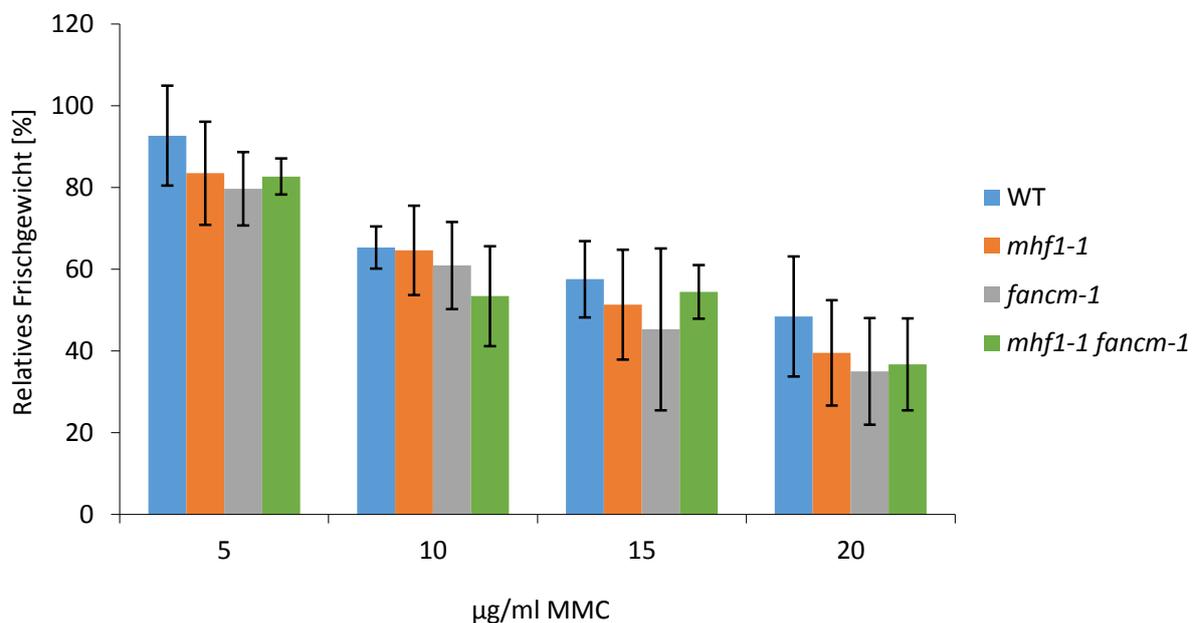


Abbildung 3.8: Relatives Frischgewicht der *mhf1-1 fancm-1* Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutanten *mhf1-1*, *fancm-1*, die Doppelmutante *mhf1-1 fancm-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. In allen getesteten Konzentrationen zeigten sowohl beide Einzelmutanten, als auch die *mhf1-1 fancm-1* Doppelmutante ein zum Wildtyp vergleichbares relatives Frischgewicht auf. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

berechnet. Der Mittelwert des relativen Frischgewichts wurde in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.9). Wie bereits in vorherigen Experimenten, zeigte auch hier die *mhf1-1* Einzelmutante keine Hypersensitivität gegenüber MMC. Das relative Frischgewicht betrug bei *mhf1-1* und dem WT zwischen 80 und 30 %. *fancjb-1* hingegen wies ein stark vermindertes Frischgewicht auf, da bereits bei 5 $\mu\text{g/ml}$ *fancjb-1* nur noch etwa die Hälfte des relativen Frischgewichts im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Die Doppelmutante *mhf1-1 fancjb-1* zeigte ein mit der *fancjb-1* Einzelmutante vergleichbares relatives Frischgewicht.

3.1.3 Die Funktion von AtMHF1 in der somatischen homologen Rekombination

In *S. pombe* konnte für Mhf1 bereits gezeigt werden, dass es, zusammen mit dem Homolog von FANCM, in die Unterdrückung von CO-Ereignissen involviert ist, indem es die Entstehung von NCO Produkten fördert (Bhattacharjee *et al.*, 2013). Um zu überprüfen, ob MHF1 in Arabidopsis ebenfalls in die somatische homologe Rekombination involviert ist, wurden beide *mhf1* Einzelmutanten

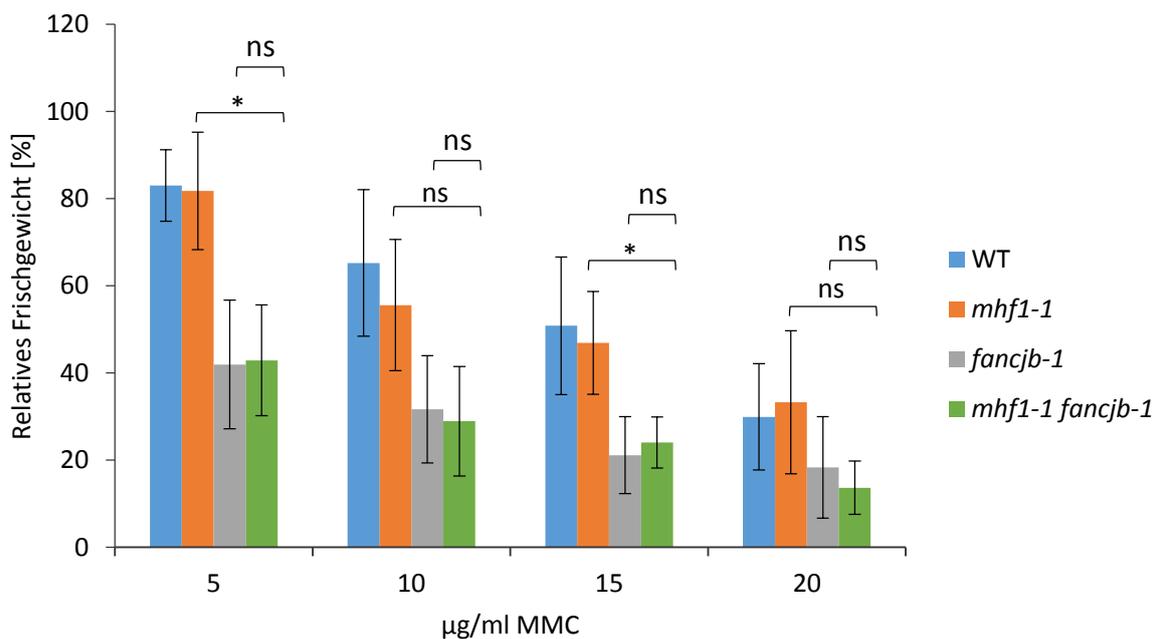


Abbildung 3.9: Relatives Frischgewicht der *mhf1-1 fancjb-1* Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutanten *mhf1-1*, *fancjb-1*, die Doppelmutante *mhf1-1 fancjb-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 $\mu\text{g/ml}$ MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. In allen getesteten Konzentrationen zeigte *mhf1-1 fancjb-1* ein vergleichbares und nicht signifikant verschiedenes relatives Frischgewicht wie die *fancjb-1* Einzelmutante auf. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*). ns = nicht signifikant.

mit der IC9 Reporterlinie gekreuzt und die Linien homozygot etabliert. Diese Reporterlinie trägt ein *GUS*-Gen, welches allerdings in Form von zwei Fragmenten vorliegt und daher nicht funktionsfähig ist. Nur durch interchromosomale Rekombination kann das *GUS*-Gen restauriert werden und ein spezifisches Substrat in einen blauen Indigofarbstoff umsetzen, was in Form von blauen Sektoren auf den Pflanzen zu sehen ist. Zur Bestimmung der Rekombinationsrate einer Linie wurden alle blauen Sektoren pro Pflanze bestimmt. Pro Linie wurden in einem Versuchsansatz 50 Pflanzen getestet und anschließend der Mittelwert der Anzahl an blauen Sektoren pro Pflanze ermittelt. Mindestens drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt, wobei der Wildtyp jedes Mal zur Kontrolle mitgetestet wurde. Zur Auswertung wurde der relative Anteil blauer Sektoren pro Pflanze einer Mutantenlinie anhand des Wildtyps berechnet und in Form eines Säulendiagramms dargestellt.

In Abbildung 3.10 ist der relative Anteil blauer Sektoren im Grundzustand der beiden *mhf1* Mutanten *mhf1-1* und *mhf1-2* im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. In beiden Mutanten war eine im Vergleich zum Wildtyp um mehr als die Hälfte verminderte Rekombinationsrate von etwa 40 % zu beobachten.

Zur Epistasisanalyse wurden auch im Rahmen der Untersuchung der somatischen homologen Rekombination in *mhf1* Mutanten die generierten Doppelmutanten mit *recq4A*, *mus81* und *fancm* bezüglich ihrer Rekombinationsrate analysiert.

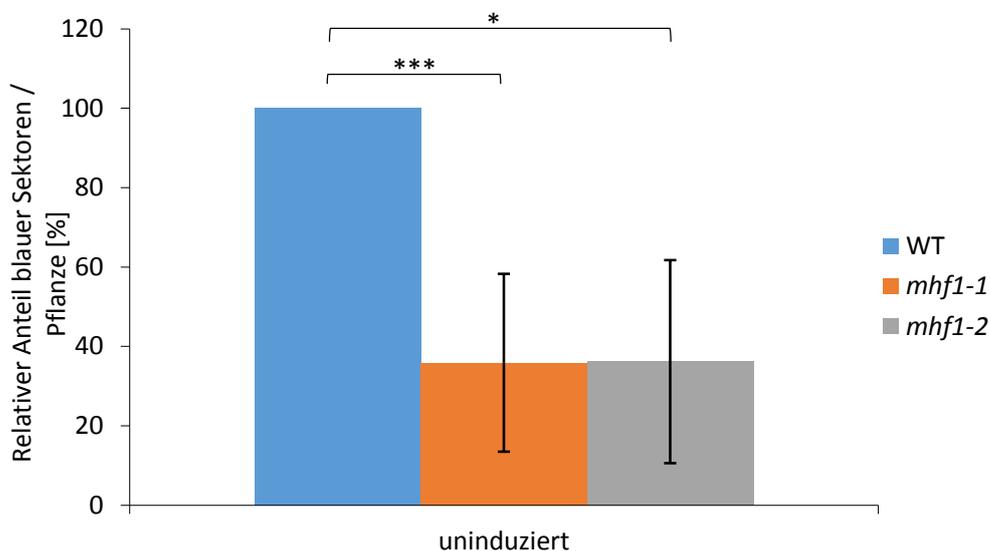


Abbildung 3.10: Spontane Rekombinationsrate der *mhf1* Einzelmutanten *mhf1-1* und *mhf1-2*.

Zur Ermittlung der Rekombinationsrate wurden beide Einzelmutanten im IC9 Reporterhintergrund untersucht und anschließend die spontane Rekombinationsrate bestimmt. Anhand des getesteten Wildtyps (WT) konnte der relative Anteil blauer Sektoren pro Pflanze ermittelt werden. Beide Einzelmutanten besaßen eine verminderte spontane Rekombinationsrate, die etwa bei 40 % im Vergleich zum Wildtyp lag. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*); p-Wert $< 0,001$ (***)

Für die RecQ-Helikase AtRECQ4A konnte bereits gezeigt werden, dass sie somatische homologe Rekombinationsereignisse unterdrückt, was zu einer erhöhten Rekombinationsrate in der *recq4A* Mutante führt (Hartung *et al.*, 2007). Die Rekombinationsrate in *mhf1* Mutanten ist im Gegensatz dazu niedriger als der Wildtyp. Um jedoch zu überprüfen, wie sich die Mutation beider Gene auf die somatische homologe Rekombination auswirkt, wurde die Doppelmutante *mhf1-1 recq4A-4* im IC9 Reporterhintergrund untersucht. Die Anzahl blauer Sektoren pro Pflanze wurde für jede Linie bestimmt und der relative Anteil anhand des getesteten Wildtyps berechnet. Die relativen Frischgewichte wurden in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.11). Die Rekombinationsrate der *mhf1-1 recq4A-4* Doppelmutante war etwa fünffach erhöht im Vergleich zum Wildtyp und auf gleichem Niveau wie die *recq4A-4* Einzelmutante. Die Rekombinationsrate von *mhf1-1* war, wie in vorherigen Experimenten bereits gezeigt, erniedrigt.

Die Nuklease AtMUS81 ist nicht nur in die Reparatur von Interstrang-CLs involviert, es konnte auch gezeigt werden, dass MUS81 die somatische homologe Rekombination fördert (Hartung *et al.*, 2006). Ähnlich wie bei *mhf1-1* Mutanten, führt auch die Mutation von *MUS81* in *Arabidopsis thaliana* zu einer verminderten Rekombinationsrate. Um zu überprüfen, ob die Doppelmutante *mhf1-1 mus81-1* eine zu den Einzelmutanten vergleichbare Rekombinationsrate aufweist oder ob diese durch Mutation beider Gene noch weiter vermindert wird, wurde die Doppelmutante auf ihre somatische Rekombinationsrate

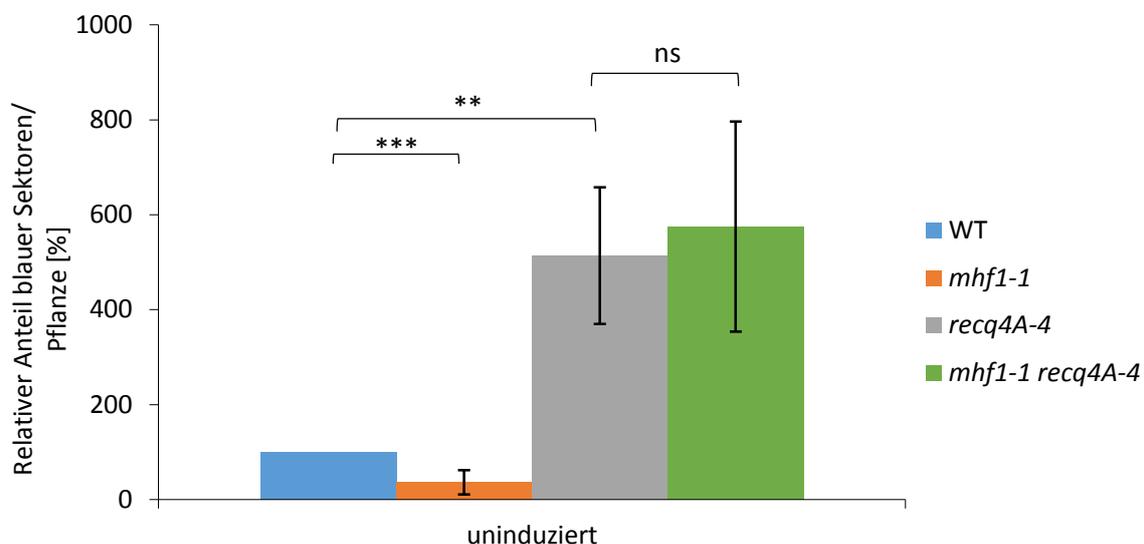


Abbildung 3.11: Spontane Rekombinationsrate der *mhf1-1 recq4A-4* Doppelmutante.

Zur Ermittlung der Rekombinationsrate wurden beide Einzelmutanten, die Doppelmutante und der Wildtyp im IC9 Reporterhintergrund untersucht und anschließend die spontane Rekombinationsrate bestimmt. Anhand des getesteten Wildtyps (WT) konnte der relative Anteil blauer Sektoren pro Pflanze ermittelt werden. Die *mhf1-1* Einzelmutante zeigte eine verminderte Rekombinationsrate, wohingegen die Rekombinationsrate in *recq4A* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Die Doppelmutante *mhf1-1 recq4A-4* weist eine mit *recq4A* vergleichbare und nicht signifikant verschiedene Rekombinationsrate auf. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert < 0,01 (**); p-Wert < 0,001 (***). ns = nicht signifikant.

untersucht. Die Anzahl blauer Sektoren pro Pflanze wurde für jede Linie bestimmt und der relative Anteil anhand des getesteten Wildtyps berechnet. Die Mittelwerte des relativen Anteils von mindestens drei unabhängigen Versuchen wurden in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.12). Beide Einzelmutanten, sowie die Doppelmutante *mhf1-1 mus81-1* wiesen eine vergleichbare Rekombinationsrate von etwa 40 % auf. Die Mutation beider Gene führt demnach nicht zu einer weiteren Verminderung der Rekombinationsrate.

Für FANCM in *Arabidopsis thaliana* konnte eine Funktion in der Unterdrückung der somatischen homologen Rekombination festgestellt werden, was in einer erhöhten Rekombinationsrate in *fancm* Mutanten resultierte (Knoll *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu weisen *Atmhf1* Mutanten eine verminderte Rekombinationsrate auf. Um zu überprüfen, wie sich die dazugehörige Doppelmutante aus *mhf1-1* und *fancm-1* verhält, wurde diese auf ihre somatische Rekombinationsrate hin untersucht. Die Anzahl blauer Sektoren pro Pflanze wurde für jede Linie bestimmt und der relative Anteil anhand des getesteten Wildtyps berechnet. Die Mittelwerte des relativen Anteils wurden in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.13). Die bereits beschriebene leicht erhöhte Rekombinationsrate der *fancm-1* Einzelmutante konnte reproduziert werden. Die Doppelmutante aus *mhf1-1* und *fancm-1* zeigte eine zur *mhf1-1* Einzelmutante vergleichbare spontane Rekombinationsrate von etwa 40 % im Vergleich zum Wildtyp auf.

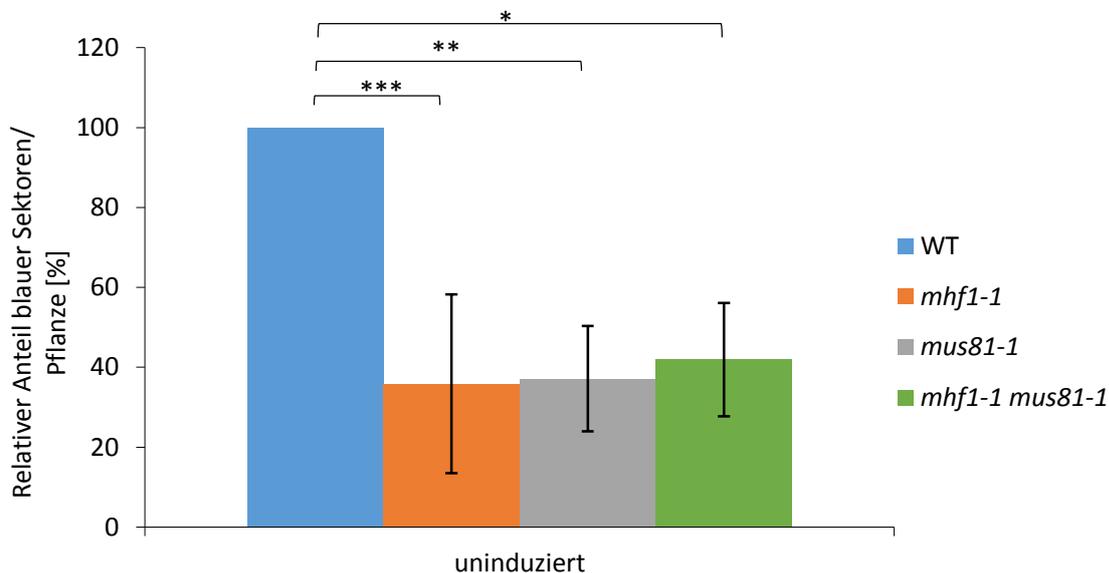


Abbildung 3.12: Spontane Rekombinationsrate der *mhf1-1 mus81-1* Doppelmutante.

Zur Ermittlung der Rekombinationsrate wurden beide Einzelmutanten, die Doppelmutante und der Wildtyp im IC9 Reporterhintergrund untersucht und anschließend die spontane Rekombinationsrate bestimmt. Anhand des getesteten Wildtyps (WT) konnte der relative Anteil blauer Sektoren pro Pflanze ermittelt werden. Die *mhf1-1* und auch die *mus81-1* Einzelmutante zeigten eine verminderte Rekombinationsrate, die in der Doppelmutante nicht verändert war. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*); p-Wert $< 0,01$ (**); p-Wert $< 0,001$ (***)

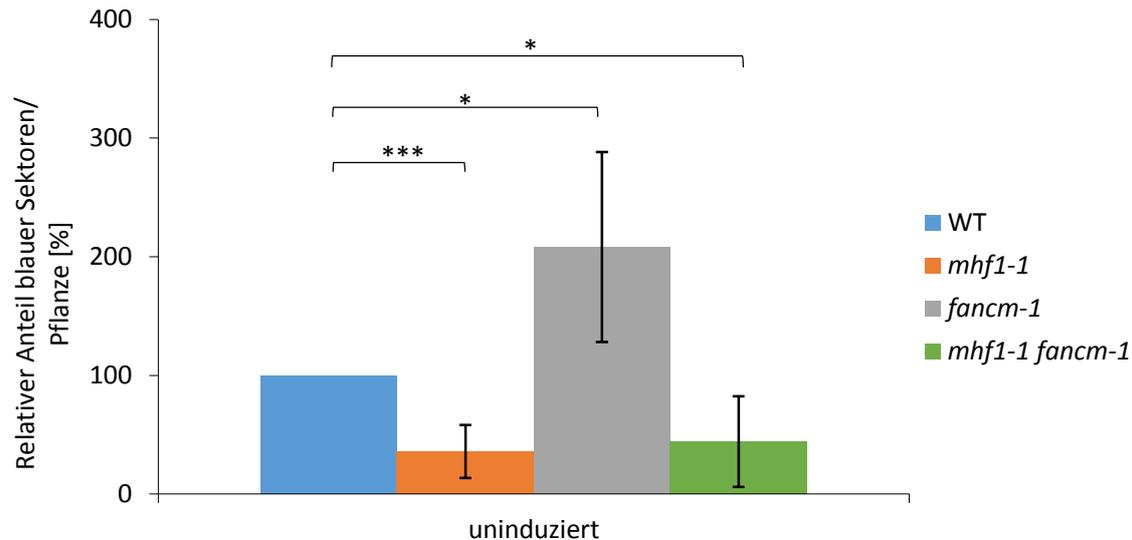


Abbildung 3.13: Spontane Rekombinationsrate der *mhfl-1 fancm-1* Doppelmutante.

Zur Ermittlung der Rekombinationsrate wurden beide Einzelmutanten, die Doppelmutante und der Wildtyp im IC9 Reporterhintergrund untersucht und anschließend die spontane Rekombinationsrate bestimmt. Anhand des getesteten Wildtyps (WT) konnte der relative Anteil blauer Sektoren pro Pflanze ermittelt werden. Die *mhfl-1* wies eine verminderte Rekombinationsrate auf, wohingegen die Rate in *fancm-1* erhöht war. Die Rekombinationsrate der *mhfl-1 fancm-1* Doppelmutante war auf Niveau der *mhfl-1* Einzelmutante. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*); p-Wert $< 0,001$ (***)).

3.1.4 Die Funktion von AtMHF1 in der Meiose

In *S. pombe* konnte bereits gezeigt werden, dass Mhf1, zusammen mit Fml1, dem Homolog von FANCM, nicht nur in die somatische homologe Rekombination involviert ist, sondern auch eine Rolle in der homologen Rekombination während der Meiose spielt (Lorenz *et al.*, 2012; Bhattacharjee *et al.*, 2013). Auch für FANCM in Arabidopsis konnte eine Funktion während der Meiose nachgewiesen werden (Knoll *et al.*, 2012). *Atfancm* Mutanten zeigten verschiedene Defekte während der Meiose auf, wie etwa unsynapsierte Bereiche, Brücken zwischen nicht-homologen Chromosomen und eine ungleiche Verteilung von Chromatiden. Weiterhin führte die Mutation von *AtFANCM* zu einer eingeschränkten Fertilität, die sich in einer geringeren Anzahl an Samen pro Schote im Vergleich zum Wildtyp zeigte. Im Wildtyp betrug die Anzahl etwa 50 Samen pro Schote, wohingegen die *fancm* Mutante nur noch etwa 20 Samen pro Schote aufwies (Knoll *et al.*, 2012). Da bereits in der Spaltheft gezeigt wurde, dass Mhf1 und Fml1 während der Meiose zusammen arbeiten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktion von AtMHF1 während der Meiose untersucht. Zunächst wurde die Fertilität der beiden *mhfl* Mutanten analysiert. Hierfür wurden pro Linie fünf Pflanzen verwendet und pro Pflanze jeweils fünf Schoten geerntet und in 70 % EtOH zum Entfärben inkubiert. Zur Auswertung wurde sowohl die Länge der einzelnen Schoten gemessen, als auch die Anzahl der Samen pro Schote und Linie

bestimmt und davon der Mittelwert gebildet. Im Gegensatz zu *Atfancm*, wiesen beide *Atmhfl* Mutanten keinen Unterschied in der Länge der Schoten und in der Anzahl der Samen im Vergleich zum Wildtyp auf (vgl. Anhang Tabelle 8.21). Dennoch wurden Meiozytenpräparationen der beiden *mhfl* Einzelmutanten *mhfl-1* und *mhfl-2* angefertigt und an einem Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. Zur Kontrolle wurden Präparationen von Wildtyp-Meiozyten angefertigt und ebenfalls ausgewertet. In Abbildung 3.14 sind die Meiozytenpräparationen der beiden Einzelmutanten und des Wildtyps dargestellt. Im Pachytänstadium (Abbildung 3.14, A-C), in dem normalerweise die Synapsis der homologen Chromosomen vollständig ausgebildet ist, waren keine Defekte in Bezug auf die Synapsis in beiden Einzelmutanten *mhfl-1* und *mhfl-2* zu beobachten. Sowohl in *mhfl-1* als auch in *mhfl-2* waren aber intensiv DAPI-gefärbte zirkuläre Strukturen detektierbar, die nur selten im Wildtyp zu beobachten waren (Abbildung 3.14, B, C, weiße Pfeile). Im folgenden Diplotänstadium liegen die homologen Chromosomen normalerweise gepaart, in Form von fünf getrennten Bivalenten vor. Sowohl in *mhfl-1* als auch in *mhfl-2* Meiozyten waren chromosomale Verbindungen zwischen diesen fünf Bivalenten vorhanden (Abbildung 3.14, D-F, weiße Pfeile). Diese Verbindungen konnten ebenfalls in frühen Anaphase I Stadien der Mutanten beobachtet werden (Abbildung 3.14, G-I) und resultierten in ungleichen Verteilungen der Chromatiden am Ende der Meiose II (Abbildung 3.14, M-O, Pfeilspitzen).

3.2 Identifikation von *FAN1* in *Arabidopsis thaliana*

An der Reparatur von Interstrang-CLs innerhalb der DNA sind in Säugern zusätzlich zu den *FANC*-Genen des Fanconi Anämie-Signalwegs auch mehrere Fanconi Anämie-assoziierte Proteine beteiligt. Neben Proteinen für die homologe Rekombination und die Translasionssynthese, müssen auch Nukleasen involviert sein, die zu Beginn der Reparatur das *unhooking* des CL übernehmen. Eine dieser Nukleasen könnte die Fanconi/FANCD2-assoziierte Nuklease FAN1 sein. Nach Aktivierung des FA-Signalwegs durch FANCM wird der FA *core* Komplex an die DNA rekrutiert, der schließlich das Heterodimer FANCI/FANCD2 monoubiquitiniert und damit aktiviert. FAN1 wiederum besitzt eine Ubiquitin-Bindezinkfinger-Domäne, über die FAN1 an monoubiquitiniertes FANCD2 binden kann und dadurch an die Schadstelle lokalisiert wird. Durch die Endonukleaseaktivität von FAN1 und die entgegengesetzte Polarität der präferierten Substrate im Vergleich zu den Nukleasen MUS81 und XPF, die beide ebenfalls als *unhooking* Nuklease im Verdacht stehen, ist FAN1 ein möglicher Kandidat für den Prozess des *unhooking* (Ciccina *et al.*, 2008). Die Mutation von *FAN1* im Menschen führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Interstrang-CL induzierenden Agenzien. Da aber noch kein FA Patient mit Mutation in *FAN1* identifiziert wurde, wird *FAN1* nicht zu den klassischen *FANC*-Genen gezählt. In *S. cerevisiae* liegt *FAN1* nicht konserviert vor, allerdings lässt sich ein Homolog zu *FAN1* in *S. pombe*

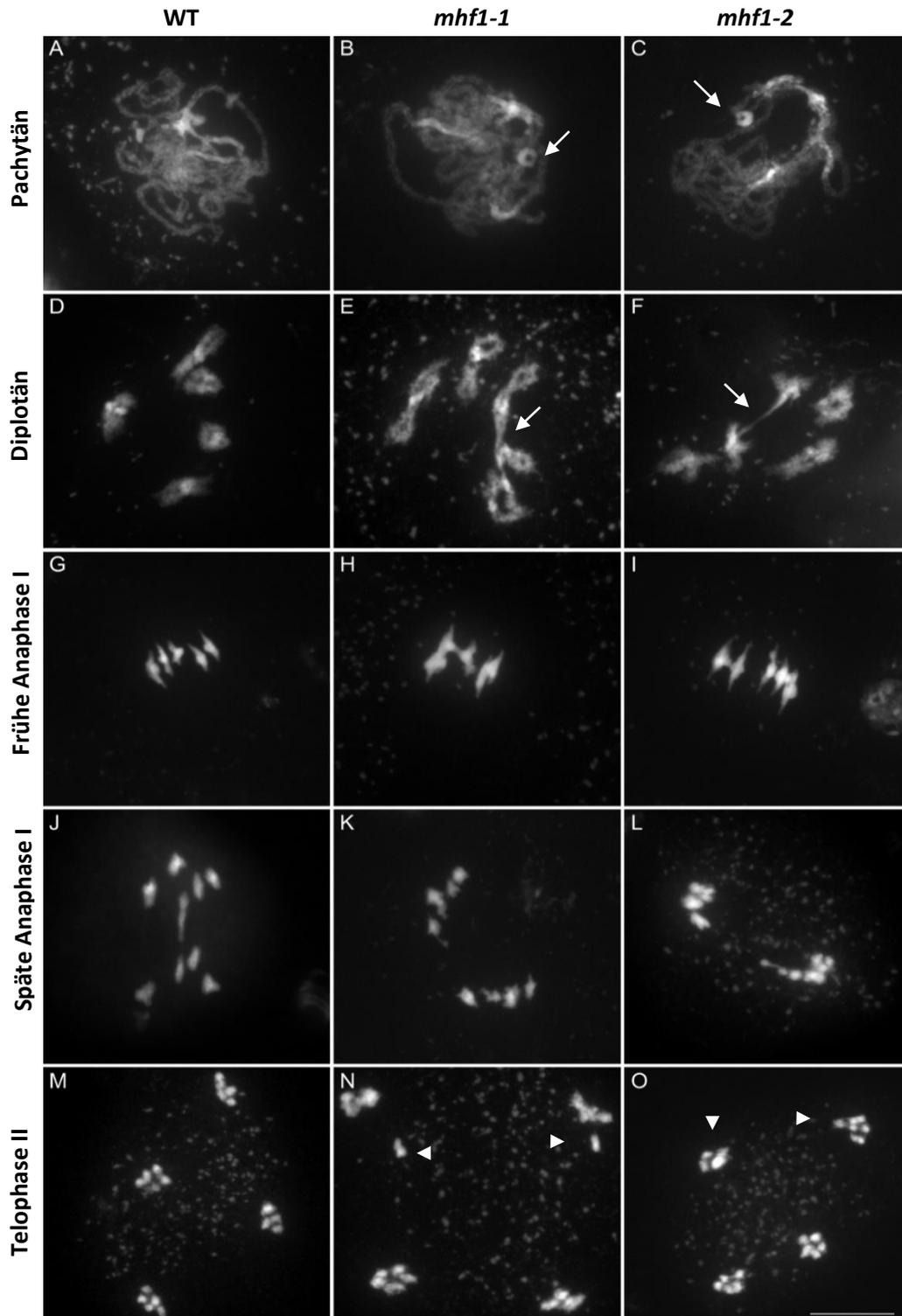


Abbildung 3.14: Präparation von Wildtyp, *mhf1-1* und *mhf1-2* Meiozyten.

Durch Meiozytenpräparation wurden die Meiosestadien von Wildtyp (WT; A, D, G, J, M), *mhf1-1* (B, E, H, K, N) und *mhf1-2* (C, F, I, L, O) Meiozyten hergestellt und mittels eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Im Pachytänstadium (A-C) wiesen beide Einzelmutanten *mhf1-1* und *mhf1-2* im Vergleich zum Wildtyp vermehrt intensiv gefärbte zirkuläre Strukturen auf (weiße Pfeile). Die homologen Chromosomen, die im Diplotänstadium (D-F) gepaart als fünf voneinander getrennte Bivalente vorliegen, waren in beiden Einzelmutanten teilweise durch Verbindungen miteinander verknüpft, die durch weiße Pfeile verdeutlicht werden. Diese Verbindungen waren ebenfalls in der frühen Anaphase zu beobachten (G-I). In späteren Stadien der Meiose wie der Telophase II war eine ungleiche Verteilung der Chromatiden zu beobachten (M-O, Pfeilspitzen). Maßstabsbalken = 10 μ m.

finden. SpFan1 ist in Hefe ebenfalls in die Reparatur von Interstrang-CLs involviert (Fontebasso *et al.*, 2013), jedoch scheint die Rekrutierung von Fan1 an den DNA-Schaden anders abzulaufen, da weder Fan1 eine UBZ-Domäne trägt, noch FANCD2 in *S. pombe* konserviert vorliegt. In Arabidopsis ist ebenfalls ein Homolog zu finden, welches aber bisher funktionell noch nicht charakterisiert wurde. Aus diesem Grund soll im Rahmen dieser Arbeit die Funktion von AtFAN1 näher untersucht werden. Ein Homolog zu Arabidopsis konnte über BLAST Analysen identifiziert werden. Es befindet sich auf dem Locus At1g48360 und setzt sich aus 15 Exons und 14 Introns mit einer Gesamtlänge von 4382 bp vom Start- zum Stopcodon zusammen. Das gebildete Protein ist 891 aa lang und besitzt eine HIRAN-Domäne und eine VRR-Nukleasedomäne (Abbildung 3.15). In Domänensuchprogrammen ist für das Protein in Arabidopsis keine UBZ-Domäne annotiert. Ein Alignment der Proteinsequenzen von HsFAN1 und AtFAN1 allerdings wies einige, in Arabidopsis konservierte Aminosäuren im Bereich der menschlichen UBZ-Domäne auf, weshalb vermutet wurde, dass auch in AtFAN1 eine UBZ-Domäne vorhanden ist. Ob diese Domäne eine Funktion innerhalb des Proteins übernimmt, wird in Abschnitt 3.2.4 näher beschrieben.

3.2.1 Bioinformatische Untersuchungen von AtFAN1

Zur Untersuchung der evolutionären Beziehungen von verschiedenen FAN1 Homologen in Tieren, Pflanzen und Pilzen wurde ein phylogenetischer Baum berechnet. Wie bereits beschrieben, sind Homologe zu HsFAN1 in den meisten Tieren, und auch Pflanzen zu finden. In *S. cerevisiae* scheint FAN1 nicht konserviert vorzuliegen, allerdings wurde ein Homolog in *S. pombe* und auch in anderen Pilzen identifiziert. Die VRR-Nukleasedomäne, die FAN1 Endo- und Exonukleaseaktivität vermittelt, ist in allen FAN1 Homologen vorhanden. Die UBZ-Domäne ist sowohl in Tieren, als auch in Pflanzen vorhanden. In Pilzen aber fehlt diese. Zur Erstellung des phylogenetischen Baums wurden die Proteinsequenzen von AtFAN1, HsFAN1, SpFan1 und weiterer Sequenzen von Tieren, Pflanzen und Pilzen verwendet. Mit diesen Sequenzen wurde zuerst ein Multisequenzalignment mit Hilfe des ClustalOmega Programms erstellt. Dieses Alignment wurde zur Erstellung eines phylogenetischen Baums verwendet, der mit Hilfe der Maximum Likelihood Methode und des Programms MEGA 6.0 zur

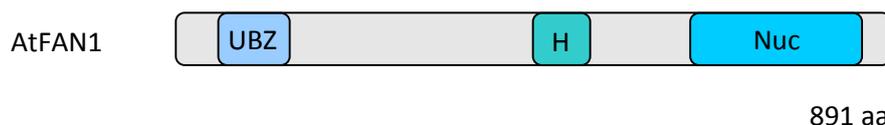


Abbildung 3.15: Aufbau des FAN1 Proteins in *Arabidopsis thaliana*.

Das Protein FAN1 in *Arabidopsis thaliana* (At) ist 891 Aminosäuren (aa) lang und setzt sich aus verschiedenen Domänen zusammen. Es weist eine Ubiquitin-Bindezinkfinger-Domäne (UBZ), eine HIRAN-Domäne (H) und eine VRR-Nukleasedomäne (Nuc) auf.

Berechnung von Verwandtschaftsbeziehungen (Tamura *et al.*, 2013), erstellt wurde. Die Phylogenie innerhalb der Taxa Tiere, Pflanzen und Pilze entspricht den Erwartungen (Abbildungen 3.16). Innerhalb der Pflanzen ist das Blasenmützenmoos (*Physcomitrella patens*) von den anderen Pflanzen abgetrennt. Die Homologe aus *Arabidopsis thaliana* und Tomate (*Solanum lycopersium*) bilden eine gemeinsame Gruppe unter Ausschluss von *Amborella trichopoda*, welches einer basalen Ordnung der Bedecktsamer zugeordnet ist. Weiterhin ist Reis (*Oryza sativa*) von diesen drei Arten ausgegrenzt, was aber mit der Tatsache erklärt werden kann, dass *Oryza* zu den Monokotyledonen zählt.

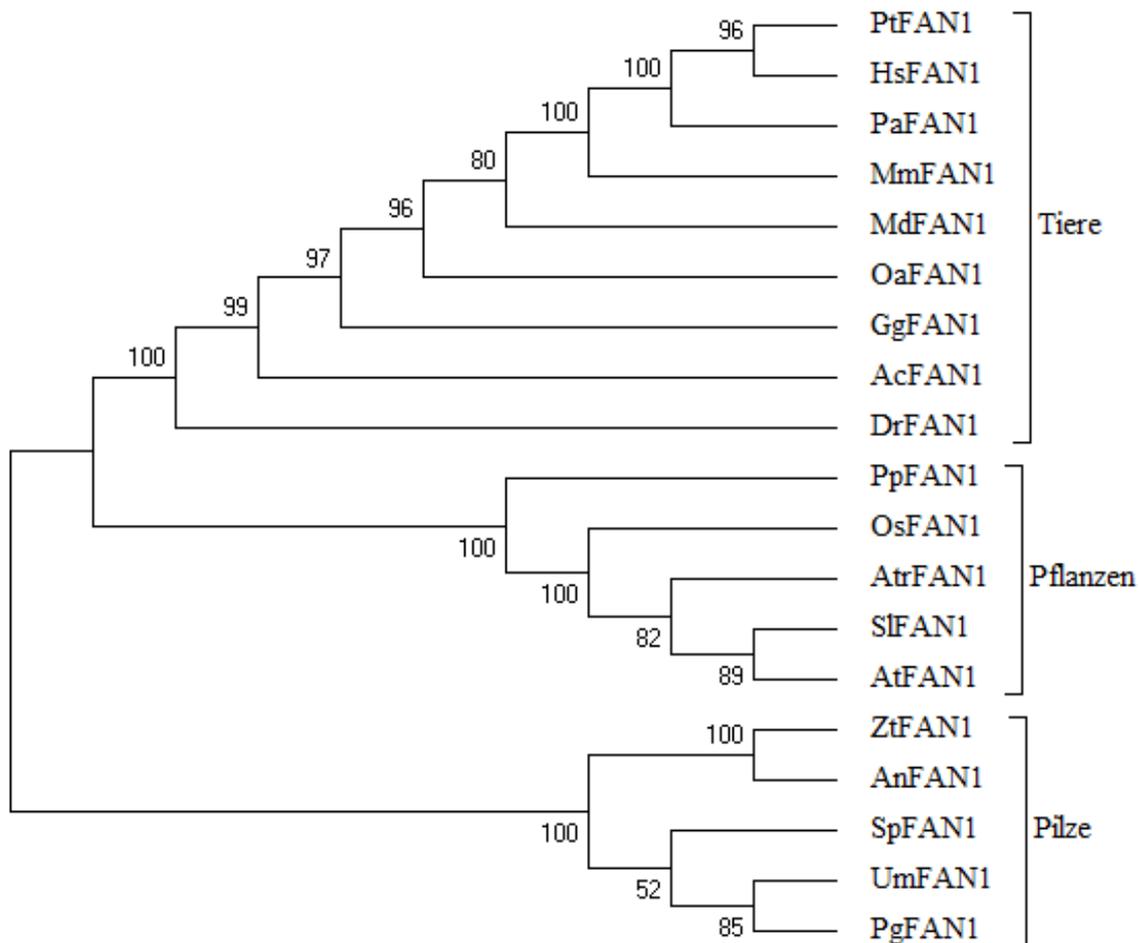


Abbildung 3.16: Maximum Likelihood Baum des ClustalOmega Alignments verschiedener FAN1 Homologe in Pflanzen, Tieren und Pilzen.

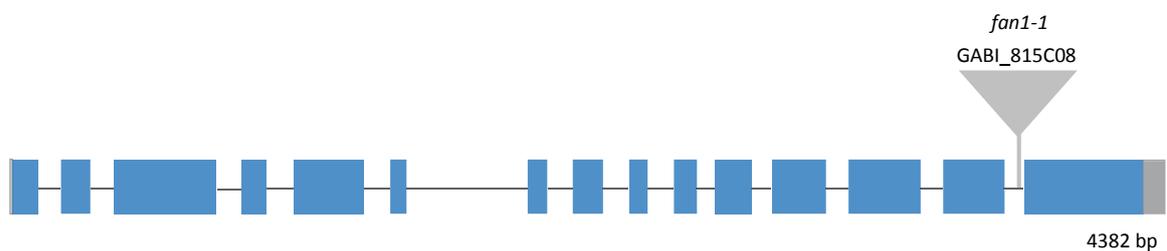
Das Alignment der homologen Proteine wurde mit Hilfe des ClustalOmega Programms durchgeführt und anschließend für die Berechnung eines phylogenetischen Baum mittels der Maximum Likelihood Methode im Programm MEGA 6.0 verwendet. Die Zahlen an den Knotenpunkten gegeben die Bootstrap Werte an. Pt (*Pan troglodytes*), Hs (*Homo sapiens*), Pa (*Pongo abelii*), Mm (*Mus musculus*), Md (*Monodelphis domestica*), Oa (*Ornithorhynchus anatinus*), Gg (*Gallus gallus*), Ac (*Anolis carolinensis*), Dr (*Danio rerio*), Pp (*Physcomitrella patens*), Os (*Oryza sativa*), Atr (*Amborella trichopoda*), Sl (*Solanum lycopersicum*), At (*Arabidopsis thaliana*), Zt (*Zymoseptoria tritici*), An (*Aspergillus nidulans*), Sp (*Schizosaccharomyces pombe*), Um (*Ustilago maydis*), Pg (*Puccinia graminis*).

3.2.2 Charakterisierung einer Insertionsmutante von *AtFAN1*

Zur Charakterisierung von *FAN1* in *Arabidopsis thaliana* wurde die T-DNA Insertionsmutante *fan1-1* (GABI_815C08) der GABI-Kat-Kollektion (Rosso *et al.*, 2003) verwendet. Für *fan1-1* konnte eine Insertion im Intron 14, direkt vor Beginn des Exons 15, gefunden werden (Abbildung 3.17 A). Allerdings konnte hier nur eine *left border* in 5'-Richtung des Gens detaillierter analysiert werden. Durch die T-DNA Insertion kam es an dieser Stelle zu einer Deletion von 1 bp der genomischen Sequenz und zu einer 34 bp langen Insertion, die der Vektorsequenz von pAC106 (*accession number* AJ537513), der zur Generierung der T-DNA Insertionsmutante *fan1-1* verwendet wurde, zugeordnet werden konnte (Abbildung 3.17 B). Die detaillierte Analyse des Integrationsort in 3'-Richtung des Gens konnte nicht näher bestimmt werden, dennoch wurde durch entsprechende PCR-Versuche gezeigt, dass die Wildtypsequenz von *FAN1* ab Position 3923 bp wieder vollständig ist.

Ebenso wie für *mhf1-1* und *mhf1-2* in Abschnitt 3.1.1 wurde auch für *fan1-1* der Einfluss der T-DNA Insertion auf die Expression des *FAN1* Gens in der Mutante überprüft. Insbesondere aufgrund der Tatsache, dass sich der Insertionsort der T-DNA in der *fan1-1* Mutante in einem Intron befindet, wodurch die T-DNA während Spleißvorgängen entfernt und dadurch keinen Einfluss auf das Transkript

A



B

fan1-1

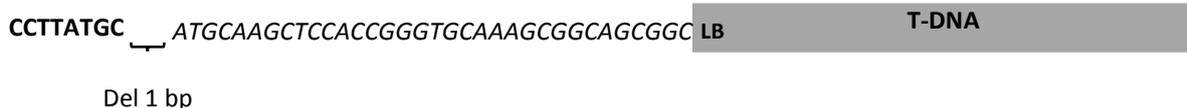


Abbildung 3.17: Charakterisierung des Insertionsbereich der *AtFAN1* Mutante *fan1-1*.

(A) Die genomische Struktur von *AtFAN1* setzt sich aus 15 Exons (blau) und 14 Introns (schwarze Linie) mit einer Gesamtlänge von 4382 bp zusammen. Der Integrationsort der Mutante *fan1-1* (GABI_815C08) befindet sich in Intron 14, direkt vor Beginn des Exons 15. Der UTR-Bereich ist in grau abgebildet. (B) Eine detaillierte Analyse des T-DNA Integrationsorts konnte nur 5' Richtung durchgeführt werden. Durch die T-DNA Insertion kam es zu einer Deletion der genomischen Sequenz von 1 bp und zu einer Insertion von 34 bp. Die genomische Sequenz ist in fett dargestellt, die Insertion ist kursiv geschrieben. Deletionen wurden mit Del abgekürzt und die genaue Länge angegeben. LB = *left border*.

nehmen könnte. Zur Überprüfung wurde eine Expressionsanalyse der *fan1-1* Mutante mit Verwendung von verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt, die ein Produkt 5' der Insertion, über die T-DNA oder 3' der T-DNA liefern konnten. Ebenso wie in Abschnitt 3.1.1 wurde hierfür die Gesamt-RNA aus der Mutante und zum Vergleich aus Wildtyppflanzen isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von *fan1-1* wurde mittels quantitativer Real-time PCR, unter Verwendung der drei verschiedenen Primerkombinationen, bestimmt. Zur Normalisierung wurde die Expression des Haushaltgens *ACTIN2* verwendet. 5' der T-DNA Insertion war in *fan1-1* eine zum Wildtyp vergleichbare Expression des *FAN1* Gens auszumachen, wohingegen über die T-DNA und 3' der Insertion nur eine sehr geringe Expression nachzuweisen war (Abbildung 3.18). Aufgrund der Tatsache, dass 5' der T-DNA Insertion eine zum Wildtyp vergleichbare Expression von *FAN1* zu messen war, ist *fan1-1* keine Nullmutante. Diese Expression könnte demnach zu einem Teilprotein führen.

3.2.3 Die Funktion von AtFAN1 in der DNA Reparatur

Die Mutation von *FAN1* im Menschen führt unter anderem zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Interstrang-CL induzierenden Agenzien wie MMC. Auch das Homolog von *FAN1* in *S. pombe* scheint

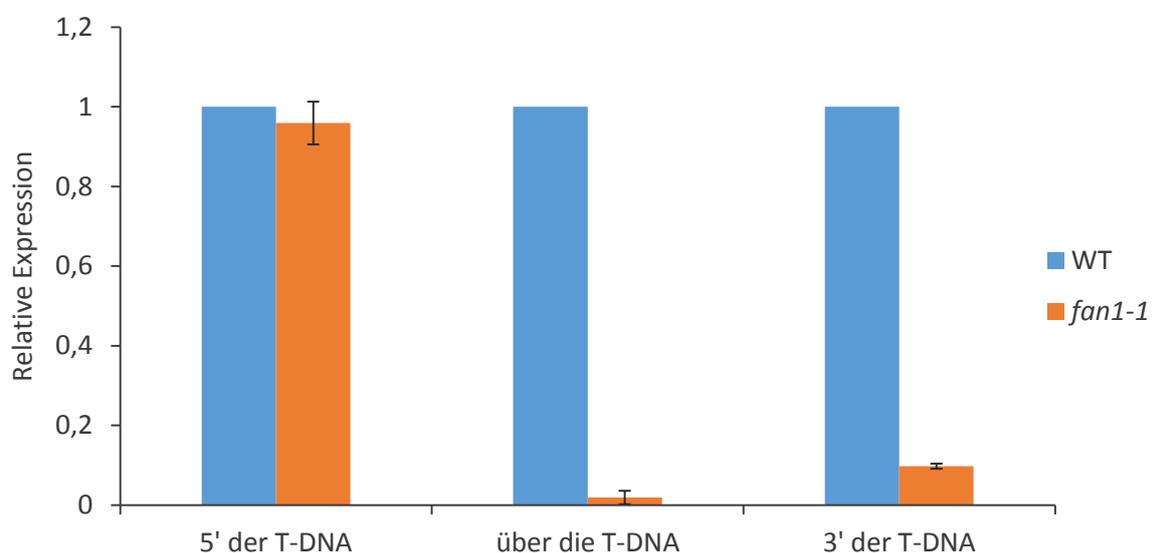


Abbildung 3.18: Bestimmung des Expressionsniveaus von *FAN1* in *fan1-1*.

Die Expression von *FAN1* in der Mutantenlinie *fan1-1* wurde mit Hilfe von drei verschiedenen Primerkombinationen bestimmt, die 5' der Insertion, über die T-DNA oder ein Produkt 3' der T-DNA Insertion liefern konnten. 5' des T-DNA Integrationsorts konnte eine Expression von *FAN1* gemessen werden, die vergleichbar mit der des Wildtyps war. Über die T-DNA und 3' der Insertion ist in *fan1-1* nur eine sehr geringe Restexpression von *FAN1* im Vergleich zum Wildtyp auszumachen.

in die Reparatur dieser Art von Quervernetzungen involviert zu sein (Fontebasso *et al.*, 2013). Um zu überprüfen, ob FAN1 in Arabidopsis ebenfalls in die Reparatur von DNA-Schäden involviert ist, wurde die Sensitivität der *fan1-1* Mutante gegenüber verschiedener Genotoxine untersucht. Hierfür wurden eine Woche alte Keimlinge mit den unterschiedlichen Genotoxinen behandelt und nach zwei Wochen Inkubation das Frischgewicht bestimmt. Gegenüber den Genotoxinen Bleomycin, *cis*-Platin, MMS, HU und CPT konnte im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhte Sensitivität beobachtet werden (vgl. Anhang Tabelle 8.23-8.28 und Abbildungen 8.6-8.10). Ebenso wie der Ausfall von *FAN1* im Menschen und in *S. pombe*, führte auch die Behandlung von *Atfan1-1* mit MMC zu einer erhöhten Sensitivität im Vergleich mit dem Wildtyp (Abbildung 3.19). Bei einer Konzentration von 5 µg/ml betrug das relative Frischgewicht von *fan1-1* etwa 60 % der unbehandelten Kontrolle im Vergleich zum Wildtyp mit 90 %. Mit Zunahme der Genotoxinkonzentration verringerte sich das relative Frischgewicht von *fan1-1* auf 40 % (bei 10 µg/ml), 30 % (bei 15 µg/ml) und auf nur noch etwa 20 % bei der Verwendung von 20 µg/ml MMC. Im Vergleich dazu betrug das relative Frischgewicht des Wildtyps bei diesen Konzentrationen etwa 80 bis 50 %.

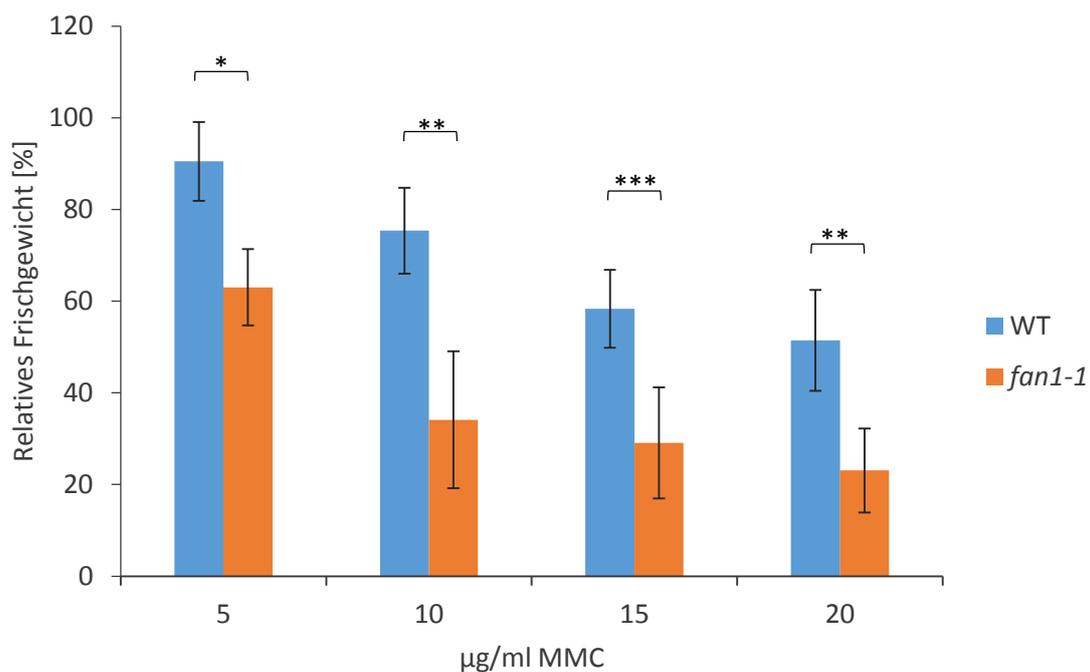


Abbildung 3.19: Relatives Frischgewicht der *fan1-1* Mutante gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutanten *fan1-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Alle getesteten Konzentrationen führten zu einer signifikant höheren Sensitivität von *fan1-1* im Vergleich zum Wildtyp. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*); p-Wert $< 0,01$ (**); p-Wert $< 0,001$ (***)

3.2.4 Komplementationsanalysen von AtFAN1 mit verschiedenen FAN1 Konstrukten

Das Protein FAN1 im Menschen setzt sich aus verschiedenen Domänen zusammen. Die UBZ Domäne, die die Interaktion von monoubiquitiniertem FANCD2 vermittelt, eine SAP DNA-Bindedomäne und eine VRR Nukleasedomäne, die sowohl eine Exo- als auch Endonukleaseaktivität besitzt. In *Arabidopsis thaliana* FAN1 ist diese VRR Nukleasedomäne ebenfalls zu finden (PFAM08774). Die UBZ Domäne ist in Domänensuchprogrammen nicht annotiert, allerdings sind in einem Alignment der Proteinsequenzen von HsFAN1 und AtFAN1 im Bereich dieser Domäne einige konservierte Bereiche vorhanden, die möglicherweise auf eine UBZ Domäne in AtFAN1 schließen lassen (Abbildung 3.15). Eine SAP DNA-Bindedomäne fehlt in Arabidopsis FAN1. Zusätzlich zu diesen Domänen besitzt das Protein in Arabidopsis noch eine weitere Domäne, die als HIRAN Domäne bezeichnet wird (PFAM08797). Die Funktion dieser Domäne ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings wird vermutet, dass die HIRAN Domäne eine Bindung an geschädigte DNA vermittelt (Iyer *et al.*, 2006). Wie in Abschnitt 3.2.2 gezeigt werden konnte, ist in der *fan1-1* Mutante in Arabidopsis eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMC zu beobachten. Allerdings stand für die Experimente nur eine einzige T-DNA Insertionsmutante zur Verfügung. Der Integrationsort der T-DNA wurde zwar bestimmt und befindet sich innerhalb des *FAN1* Gens, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine oder mehrere zusätzliche Insertionen der T-DNA in anderen Bereichen des Genoms vorhanden sind. Wäre dies der Fall, so könnte der beobachtete Phänotyp auch auf Mutation anderer genomischer Bereiche zurückzuführen sein. Weiterhin können Translokationen der T-DNA nicht ausgeschlossen werden, die ebenfalls zu Defekten in der Zelle führen können. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Hypersensitivität gegenüber MMC in der *fan1-1* Mutante wirklich auf die Mutation des *FAN1* Gens zurückzuführen ist, wurde die genomische Wildtypsequenz von AtFAN1 mit natürlichem Promotor und Terminator amplifiziert (Abbildung 3.20) und mittels In-Fusion Reaktion in den pSBO-2 Vektor eingefügt. Durch Agrobakterien-vermittelte Transformation wurde das Wildtypkonstrukt schließlich in die *fan1-1* Mutante eingebracht. Nachdem das Konstrukt in die Mutante eintransformiert wurde, wurden die Primärtransformanten (T1 Generation) durch die auf der T-DNA enthaltene PPT Resistenz selektiert. In der anschließenden T2 Generation wurden die erhaltenen Samen wieder auf Selektionsmedium ausgebracht und *single-locus* Linien, die ein 3:1 Aufspaltungsmuster bezüglich ihres Wachstums zeigten, identifiziert (vgl. Abschnitt 2.2.6). In der T3 Generation wurden schließlich noch diejenigen Linien identifiziert, die die T-DNA nicht nur *single-locus*, sondern auch homozygot enthielten. Für die Komplementationsanalysen wurden vier genetisch unterschiedliche, homozygot etablierte *fan1-1::FAN1* WT Linien auf ihre Sensitivität gegenüber MMC untersucht. Ist die in *fan1-1* beobachtete erhöhte Sensitivität gegenüber MMC wirklich auf die Mutation des *FAN1* Gens zurückzuführen, so sollte diese Hypersensitivität durch Einbringen des FAN1 WT Konstrukts aufgehoben werden. Hierfür wurden die Komplementationslinien, die *fan1-1* Mutante und der Wildtyp

mit verschiedenen Konzentrationen an MMC behandelt und nach zwei Wochen Inkubation das Frischgewicht bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anschließend anhand der unbehandelten Kontrolle berechnet. Insgesamt wurde der Versuch mindestens dreimal durchgeführt, wobei sich schließlich der Mittelwert des relativen Frischgewichts und die dazugehörige Standardabweichung berechnen ließen (Abbildung 3.21). Die *fan1-1* Einzelmutante zeigte, wie bereits in vorherigen Experimenten, eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Sensitivität gegenüber MMC, die sich durch ein vermindertes relatives Frischgewicht von 75 bis 20 % im Vergleich zum Wildtyp mit 95 bis 60 % der unbehandelten Kontrolle auszeichnete. In allen vier genetisch unterschiedlichen *fan1-1::FAN1* WT Linien (ND572, ND573, ND574, ND589) konnte die Hypersensitivität von *fan1-1* aufgehoben werden, was in einem zum Wildtyp vergleichbaren relativen Frischgewicht resultierte.



Abbildung 3.20: Aufbau des FAN1 Wildtypkonstrukts.

Zur Amplifikation des FAN1 Wildtypkonstrukts (WT) wurde die genomische WT Sequenz von *FAN1* verwendet. Das Konstrukt setzt sich daher aus der möglichen UBZ-Domäne, der HIRAN-Domäne (H) und der VRR-Nukleasedomäne (Nuc) zusammen. Das FAN1 WT Konstrukt steht unter der Kontrolle des natürlichen *FAN1* Promotors (P) und Terminators (T). LB = left border der T-DNA, RB = right border der T-DNA.

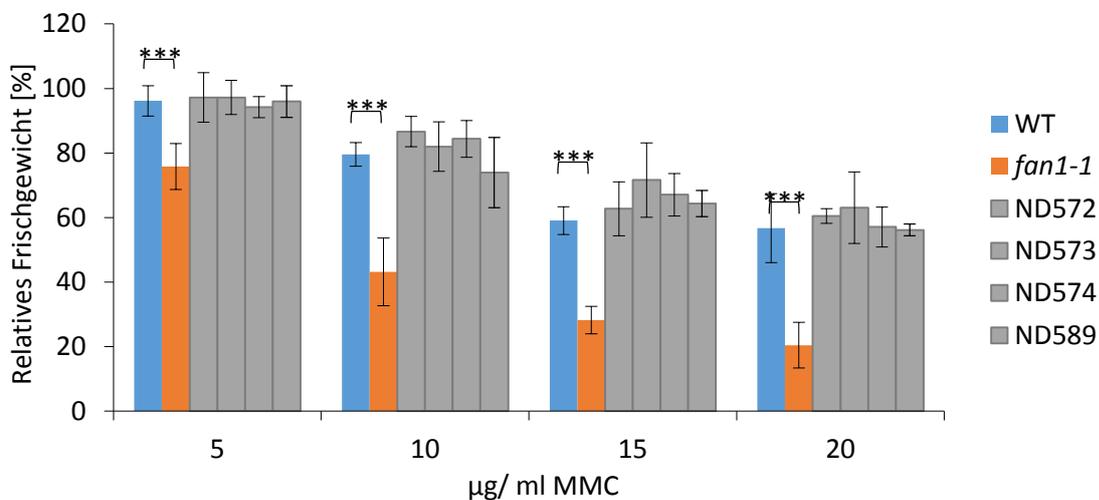


Abbildung 3.21: Relatives Frischgewicht der *fan1-1::FAN1* WT Linien gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutante *fan1-1*, der Wildtyp (WT) und die vier genetisch unterschiedlichen *fan1-1::FAN1* WT Linien (ND572, ND573, ND574, ND589) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Bei allen getesteten Konzentrationen zeigte die *fan1-1* Einzelmutante im Vergleich zum Wildtyp ein signifikant vermindertes relatives Frischgewicht auf. Diese Hypersensitivität konnte in den vier Komplementationslinien aufgehoben und auf Niveau des WT gebracht werden. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert < 0,001 (***).

Um zu überprüfen, ob die VRR-Nukleasedomäne für die Funktion von FAN1 in die Reparatur von Interstrang-CLs involviert ist, wurden zwei verschiedene Konstrukte mit jeweils einer Punktmutation innerhalb der Nukleasedomäne generiert. Diese Punktmutationen der Nukleasedomäne wurden bereits im Menschen durchgeführt und stellen Austausche von für FAN1 essentielle Aminosäuren dar, die die Endonukleaseaktivität von FAN1 an verzweigten DNA-Strukturen verhindern sollen (Kratz *et al.*, 2010). In Arabidopsis FAN1 liegen diese Aminosäuren ebenfalls konserviert vor. Zur Amplifikation wurde die genomische Sequenz von FAN1 mit natürlichem Promotor und Terminator verwendet, wobei jedoch mit Hilfe von spezifischen Primern jeweils die Punktmutationen eingeführt wurden. Bei den Punktmutationen handelte es sich zum einen um einen Aminosäureaustausch der Asparaginsäure zu Alanin an Position 833 (D833A), was als FAN1 NUC1 bezeichnet wurde und zum anderen um einen Austausch von Lysin zu Alanin an Position 854 (K854A), was FAN1 NUC2 genannt wurde (Abbildung 3.22). Ebenso wie für das FAN1 WT Konstrukt wurden auch hier die Konstrukte mittels InFusion Reaktion in den pSBO-2 Vektor eingebracht und anschließend durch Agrobakterien-vermittelte Transformation in die *fan1-1* Mutante eintransformiert. Für die Überprüfung der Sensitivität wurden auch hier pro Konstrukt jeweils vier genetisch unterschiedliche Linien etabliert. Die Komplementationslinien, die *fan1-1* Mutante und der Wildtyp wurden ebenfalls mit verschiedenen Konzentrationen an MMC behandelt und nach zwei Wochen Inkubation das Frischgewicht bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anschließend anhand der unbehandelten Kontrolle berechnet. Insgesamt wurde der Versuch mindestens dreimal durchgeführt, wobei sich schließlich der Mittelwert des relativen Frischgewichts und die dazugehörige Standardabweichung berechnen ließen (Abbildung 3.23 A und B). Die Linien *fan1-1::FAN1 NUC1* waren nicht in der Lage, die erhöhte Sensitivität von *fan1-1* zu komplementieren. Das Niveau des relativen Frischgewichts war vergleichbar mit dem der *fan1-1* Einzelmutante und befand sich zwischen etwa 60 und 20 % (Abbildung 3.31 A). Die Linien, die das zweite Nukleasekonstrukt (*fan1-1::FAN1 NUC2*) trugen, zeigten einen intermediären Phänotyp und konnten die starke Sensitivität der *fan1-1* Einzelmutante nur partiell komplementieren (Abbildung 3.23 B).

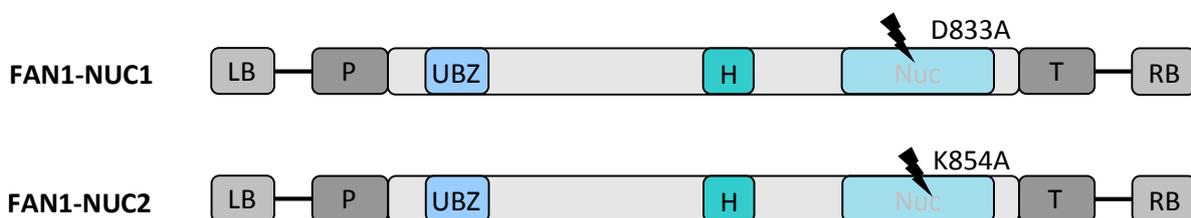


Abbildung 3.22: Aufbau der FAN1 Konstrukte mit Punktmutation in der Nukleasedomäne.

Zur Amplifikation der Konstrukte wurde die genomische WT Sequenz von *FAN1* verwendet und mittels spezifischer Primer pro Konstrukt eine Punktmutation innerhalb der Nukleasedomäne eingefügt. Für das erste Konstrukt NUC1 wurde ein Aminosäureaustausch der Asparaginsäure (D) zu Alanin (A) an Position 833 durchgeführt. Das zweite Konstrukt NUC2 enthält einen Austausch der Aminosäure Lysin (K) zu Alanin (A) an Position 854. (UBZ) = UBZ-Domäne, (H) = HIRAN-Domäne, (Nuc) = VRR-Nukleasedomäne. Beide FAN1 Konstrukte stehen unter der Kontrolle des natürlichen *FAN1* Promotors (P) und Terminators (T). LB = left border der T-DNA, RB = right border der T-DNA

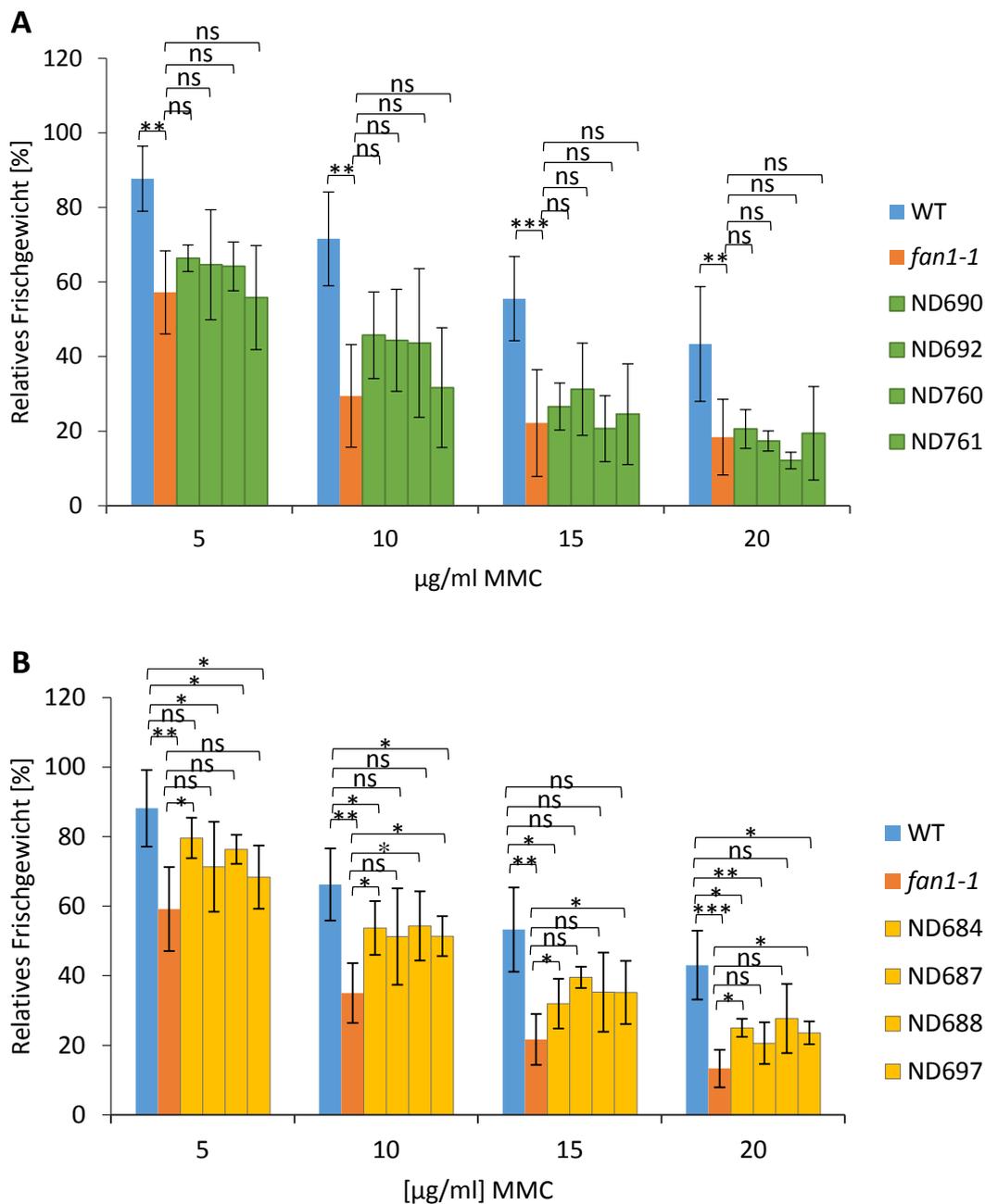


Abbildung 3.23: Relatives Frischgewicht der *fan1-1::FAN1* NUC1 und *fan1-1::FAN1* NUC2 Linien gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutante *fan1-1*, der Wildtyp (WT) und die pro Konstrukt jeweils vier genetisch unterschiedlichen Linien wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. (A) Das relative Frischgewicht der *fan1-1::FAN1* NUC1 Linien (ND690, ND692, ND760, ND761) zeigte ein mit *fan1-1* vergleichbar vermindertes relatives Frischgewicht im Vergleich zum Wildtyp auf. (B) Die Linien *fan1-1::FAN1* NUC2 (ND684, ND687, ND688, ND697) zeigten einen intermediären Phänotyp auf, da sich das relative Frischgewicht zwischen dem des Wildtyps und dem der *fan1-1* Einzelmutante befand. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*); p-Wert $< 0,01$ (**); p-Wert $< 0,001$ (***). ns = nicht signifikant.

Für die Überprüfung ob die mögliche UBZ-Domäne in AtFAN1 zur Reparatur von Interstrang-CLs benötigt wird, wurde ein Konstrukt kloniert, welches eine komplette Deletion der möglichen UBZ-Domäne aufwies (Abbildung 3.24). Wie bei den anderen Konstrukten auch, wurde dieses mittels In-Fusion Reaktion in den pSBO-2 Vektor eingebracht und anschließend durch Agrobakterienvermittelte Transformation in die *fan1-1* Mutante eintransformiert. Für die Überprüfung der Sensitivität wurden auch hier pro Konstrukt jeweils vier genetisch unterschiedliche Linien etabliert. Die Komplementationslinien, die *fan1-1* Mutante und der Wildtyp wurden ebenfalls mit verschiedenen Konzentrationen an MMC behandelt und nach zwei Wochen Inkubation das Frischgewicht bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anschließend anhand der unbehandelten Kontrolle berechnet. Der Mittelwert des relativen Frischgewichts und die dazugehörige Standardabweichung wurden berechnet und in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.25). Alle vier getesteten FAN1 Del UBZ Linien konnten die erhöhte Sensitivität der *fan1-1* Mutante nach Behandlung mit MMC nicht komplementieren.

3.2.5 Die Funktion von AtFAN1 bei Replikationsstress im Wurzelmeristem

Die Untersuchung des Wurzelmeristems mit Hilfe des Farbstoffs Propidiumiodid stellt eine Methode dar, um spontan auftretenden Replikationsstress in Mutanten in Form von abgestorbenen Zellen zu untersuchen. Propidiumiodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Lage ist, die perforierte Membran von toten Zellen zu durchdringen und diese damit anzufärben. Die Membran von lebenden Zellen kann er allerdings nicht durchdringen. Innerhalb des Wurzelmeristems findet größtenteils die Zellteilung statt. Das Wurzelmeristem setzt sich aus der Stammzellnische (SZN) und den transient amplifizierenden Zellen (TA-Zellen) zusammen. Die Stammzellnische befindet sich etwa fünf bis sechs Zellreihen über der Wurzelspitze. Anhand der Lage relativ zum Ruhezentrum (*quiescent center*, QC) können die verschiedenen Stammzellarten und die TA-Zellen erkannt und identifiziert werden. Man unterscheidet dabei zwischen vier Stammzellarten: Epidermale Stammzellen (SZ), die sich zu Epidermiszellen und zu Zellen der lateralen Wurzelhaube differenzieren; die Endodermis SZ, die später die Endodermis bilden; die Columella SZ, die ausdifferenziert die zentrale Wurzelhaube bilden und die vaskulären SZ, die später das Leitgewebe bilden. Aufgrund der Tatsache, dass die Stammzellen ständig



Abbildung 3.24: Aufbau des FAN1 Konstrukts mit Deletion der UBZ-Domäne.

Zur Amplifikation des Konstrukts wurde die genomische WT Sequenz von *FAN1* verwendet und mittels spezifischer Primer die Deletion der UBZ-Domäne durchgeführt (roter Stern). (H) = HIRAN-Domäne, (Nuc) = VRR-Nukleasedomäne. Das FAN1 Konstrukt steht unter der Kontrolle des natürlichen *FAN1* Promotors (P) und Terminators (T). LB = *left border* der T-DNA, RB = *right border* der T-DNA.

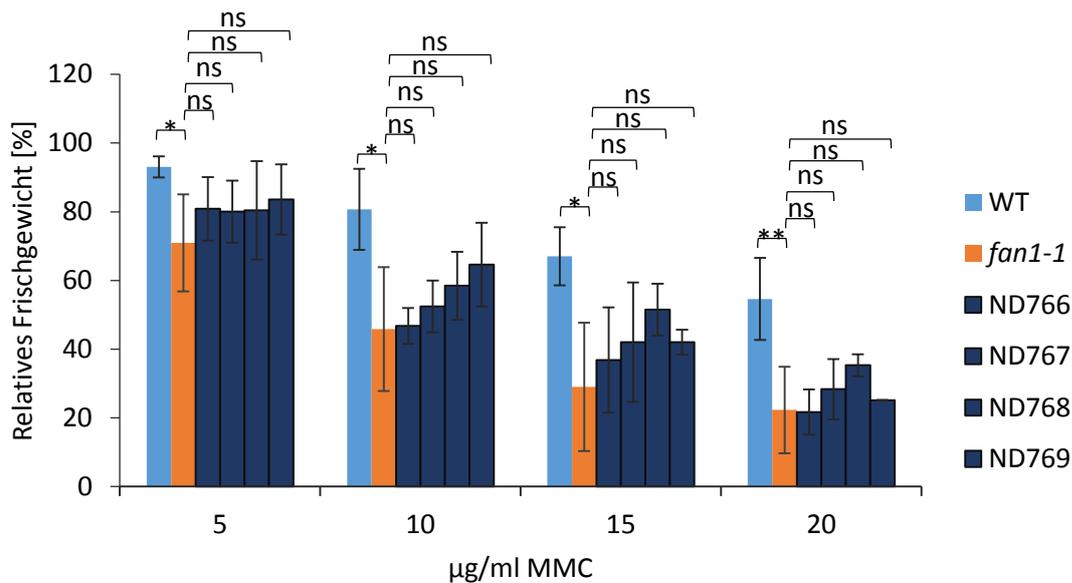


Abbildung 3.25: Relatives Frischgewicht der *fan1-1::FAN1* Del UBZ Linien gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutante *fan1-1*, der Wildtyp (WT) und die vier genetisch unterschiedlichen Linien wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Das relative Frischgewicht der *fan1-1::FAN1* Del UBZ Linien (ND766, ND767, ND768, ND769) zeigten ein mit *fan1-1* vergleichbar vermindertes relatives Frischgewicht im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*); p-Wert $< 0,01$ (**). ns = nicht signifikant.

in Kontakt zum ruhenden Zentrum stehen, bleiben sie in einem undifferenzierten Zustand. Das ruhende Zentrum selbst teilt sich normalerweise nicht. Werden nun DNA-Schäden induziert, die zu Replikationsstress innerhalb der Stammzellen führen, wird die Replikation zunächst gehemmt und auch die Zellteilung inhibiert. Kann der Schaden aufgrund von fehlenden Proteinen oder aufgrund der Anhäufung von DNA-Schäden nicht repariert werden, führt dies zum Absterben der Zellen. Wie bereits weiter oben beschrieben, färbt PI nur abgestorbene Zellen an. Weist eine Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Anzahl abgestorbener und damit PI gefärbter Zellen auf, so ist das in der Mutante ausgeschaltete Gen wahrscheinlich in die Reparatur von Replikationsstress oder in den programmierten Zelltod involviert. Für die Nuklease FAN1 wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der PI Wurzelfärbung die Funktion von AtFAN1 innerhalb der Reparatur von spontanem Replikationsstress untersucht. Neben der Untersuchung von spontanem Replikationsstress können mit Hilfe der PI Wurzelfärbung und der Verwendung von Genotoxinen auch die Beteiligung von verschiedenen Genen an der Reparatur spezifischer DNA-Schäden analysiert werden. Diese DNA-Schäden können durch die Verwendung von Genotoxinen induziert werden. In Abschnitt 3.2.3 konnte bereits eine Funktion von *FAN1* innerhalb der Reparatur von Interstrang-CLs identifiziert werden, da die Mutation von *FAN1* zu einer Hypersensitivität gegenüber MMC führte. Neben den Sensitivitätstests sollte die erhöhte

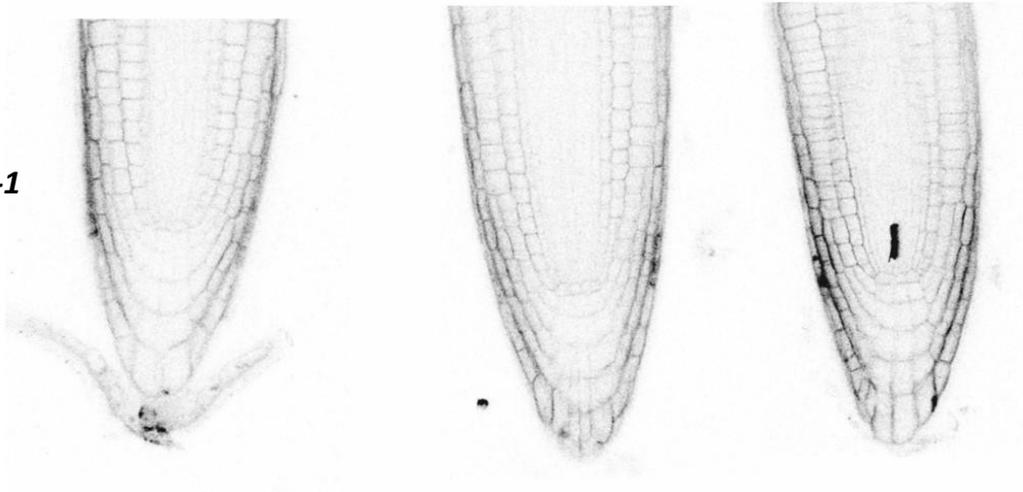
Sensitivität von *fan1-1* gegenüber MMC mit Hilfe der PI Färbung des Wurzelmeristems überprüft werden. Hierfür wurden fünf Tage alte Pflanzen der Mutante und zum Vergleich auch des Wildtyps mit 2,5 µg/ml MMC behandelt und nach 18 Stunden Inkubation einer PI-Färbung unterzogen. Zur Untersuchung des spontanen Replikationsstress wurden die Pflanzen auch im Grundzustand, ohne Induktion von Schäden, untersucht. Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Konfokalmikroskop. Aufgrund dessen, dass einzelne Zellen nicht voneinander zu unterscheiden waren, wurde die Anzahl an Wurzeln bestimmt, die mindestens eine tote Stammzelle aufwies. Dabei wurde jedoch nach Stammzelltyp unterschieden. Abbildung 3.26 A zeigt Beispielbilder der gefärbten Wurzeln im Grundzustand, wohingegen in Abbildung 3.26 B ein Säulendiagramm mit der Auswertung dargestellt ist. Im Grundzustand wies die *fan1-1* Mutante einen vergleichbaren Anteil an toten TA-Zellen wie der Wildtyp auf, der sich bei etwa 12 % befand. Andere tote Stammzellarten konnten nicht identifiziert werden. Abbildung 3.27 A zeigt Beispielbilder der gefärbten Wurzeln nach Zugabe von 2,5 µg/ml MMC, wohingegen in Abbildung 3.27 B die Auswertung der Wurzelfärbung dargestellt ist. Auffallend ist, dass im Wildtyp nur tote vaskuläre Stammzellen und TA-Zellen mit einem Anteil von 20 % zu finden waren. Im Wildtyp wurden keine anderen toten Stammzellarten gefunden. Der Anteil an toten vaskulären SZ in der *fan1-1* Mutante ist vergleichbar mit dem des Wildtyps. Im Vergleich zum Wildtyp wurde die doppelte Anzahl (40 %) tote TA-Zellen in der *fan1-1* Mutante beobachtet. Weiterhin wurden auch noch andere tote Stammzellarten in der Mutante gefunden. Endodermis-SZ waren zu einem Anteil von 20 % gefärbt. Der Anteil an toten Epidermis-SZ und an toten Zellen des ruhenden Zentrums belief sich auf 10 %.

3.2.6 Die Funktion von AtFAN1 in der somatischen homologen Rekombination

Um zu überprüfen, ob FAN1 in *Arabidopsis thaliana* in die somatische homologe Rekombination involviert ist, wurde *fan1-1* mit der IC9 Reporterlinie gekreuzt und homozygot etabliert. Die homozygote Linie wurde anschließend auf ihre somatische homologe Rekombinationsrate hin untersucht. Zur Auswertung wurde der relative Anteil blauer Sektoren pro Pflanze einer Mutantenlinie anhand des Wildtyps berechnet und in Form eines Säulendiagramms dargestellt. In Abbildung 3.28 ist der relative Anteil blauer Sektoren im Grundzustand von *fan1-1* im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Es war kein Unterschied der spontanen Rekombinationsrate in *fan1-1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auszumachen.

A

WT

*fan1-1*

B

Grundzustand

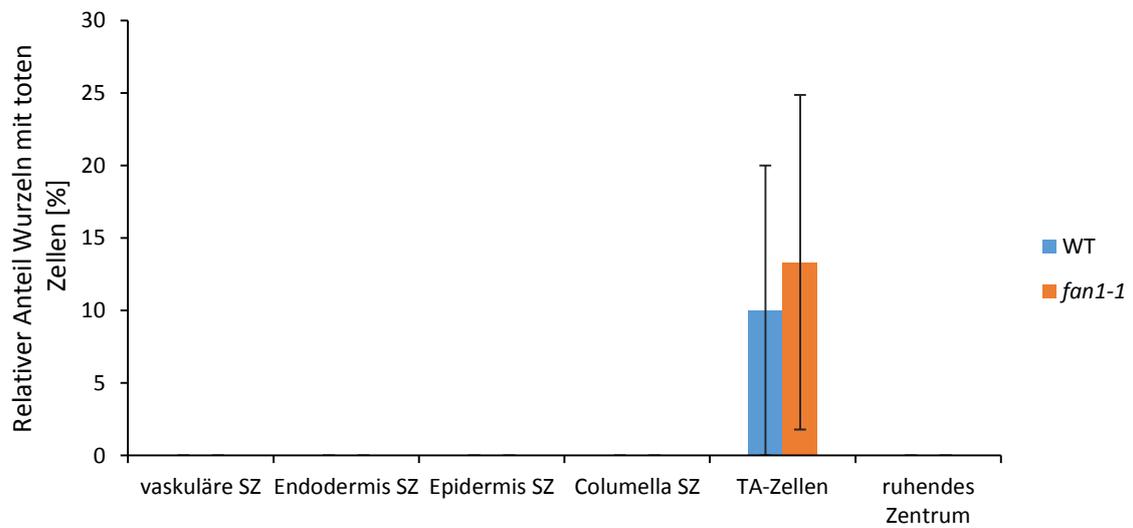


Abbildung 3.26: Zelltod im Grundzustand in WT und *fan1-1* Wurzeln.
Die Legende befindet sich auf der folgenden Seite.

Abbildung 3.26: Zelltod im Grundzustand in WT und *fan1-1* Wurzeln. Abb. auf vorheriger Seite.

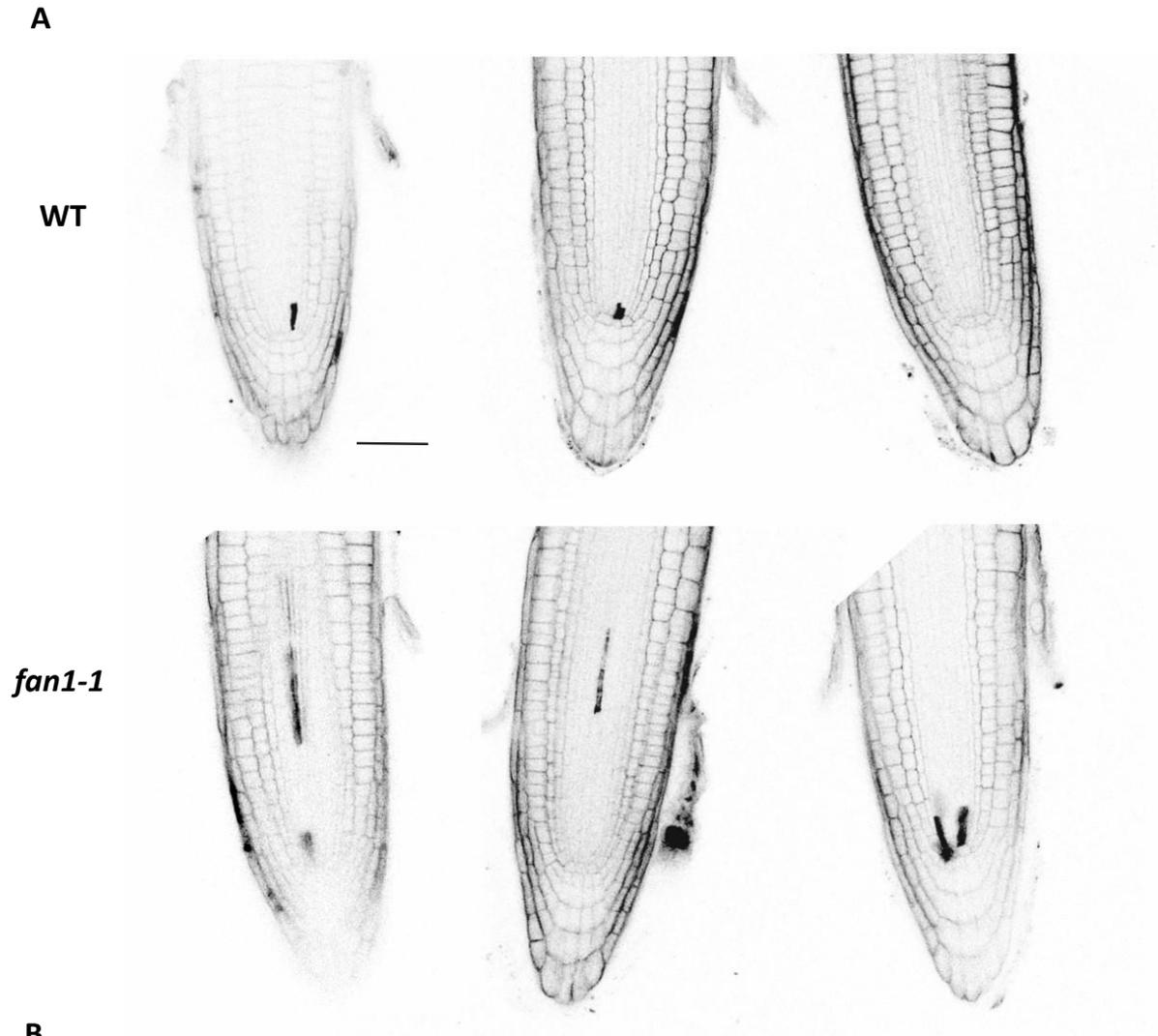
(A) Beispielbilder gefärbter Wurzeln im WT (oben) und in der *fan1-1* Mutante (unten). Im ersten Wildtypbild sind die unterschiedlichen Stammzellarten schematisch eingezeichnet. Gelb = Ruhendes Zentrum, blau = Columella SZ, lila = Epidermis/laterale Wurzelhauben SZ, grün = Kortex/Endodermis SZ, rot = TA-Zellen. (B) Auswertung der gefärbten Wurzeln im Grundzustand. Im Grundzustand ließen sich sowohl in WT, als auch in *fan1-1* Wurzeln nur Wurzeln mit toten TA-Zellen zu einem Anteil von etwa 12 % beobachten. Maßstab = 20 µm.

3.2.7 Einordnung von FAN1 in die Interstrang-CL Reparatur

Zur Einordnung von FAN1 in die Interstrang-CL Reparatur wurden im Rahmen dieser Arbeit Epistasisanalysen mit den in Arabidopsis bekannten Interstrang-CL Genen *RECQ4A*, *MUS81* und *RAD5A* durchgeführt. Hierfür wurden Doppelmutanten mit *fan1-1* und *recq4A-4*, *mus81-1* und *rad5A-2* generiert und homozygot etabliert. Die Doppelmutanten wurden schließlich auf ihre Sensitivität gegenüber MMC untersucht. Agieren diese Proteine in unterschiedlichen Signalwegen, so sollte das relative Frischgewicht der jeweiligen Doppelmutante im Vergleich zu den Einzelmutanten geringer ausfallen. Da im Menschen FAN1 wahrscheinlich zusammen mit MHF1 und FANCB im FA-Signalweg agiert, wurden auch die Doppelmutanten von *fan1-1* mit *mhf1-1* und *fancjb-1* bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber MMC untersucht.

Zur Überprüfung der Sensitivität der Doppelmutante *fan1-1 recq4A-4*, wurden diese, die beiden Einzelmutanten und der Wildtyp für zwei Wochen mit verschiedenen Konzentrationen an MMC inkubiert. Anschließend wurde das Gewicht der getesteten Pflanzen bestimmt und das relative Frischgewicht anhand der unbehandelten Kontrolle berechnet. Der Mittelwert des relativen Frischgewichts wurde in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.29). Die *fan1-1* Einzelmutante zeigte, wie bereits in vorherigen Experimenten, eine erhöhte Sensitivität gegenüber MMC. Das relative Frischgewicht betrug bei den getesteten Konzentrationen zwischen 55 und 15 % der unbehandelten Kontrolle, im Vergleich zum relativen Frischgewicht des Wildtyps, das zwischen 75 und 25 % aufwies. Die Doppelmutante aus *fan1-1* und *recq4A-4* wies ein zu *fan1-1* vergleichbares und nicht signifikant verschiedenes relatives Frischgewicht auf, wohingegen sich das relative Frischgewicht der Doppelmutante zur *recq4A-4* Einzelmutante bei 5, 10 und 15 µg/ml MMC signifikant unterscheidet. Eine Behandlung mit 20 µg/ml MMC führte in beiden Einzelmutanten, sowie in der Doppelmutante, zu einem vergleichbaren relativen Frischgewicht von nur noch 15 % der unbehandelten Kontrolle.

Wie *fan1-1 recq4A-4* wurde auch die *fan1-1 mus81-1* Doppelmutante auf ihre Sensitivität gegenüber MMC untersucht. Dazu wurden die Doppelmutante, beide Einzelmutanten und der Wildtyp für zwei Wochen mit verschiedenen Konzentrationen MMC inkubiert und das Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte wurden anhand der unbehandelten Kontrollen berechnet. Die Mittelwerte des relativen Frischgewichts wurden berechnet und in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.30). Das relative Frischgewicht der *fan1-1 mus81-1* Doppelmutante betrug nach Behandlung mit 5 und 10 µg/ml MMC nur noch etwa 25 und 20 % und war damit signifikant vermindert



B

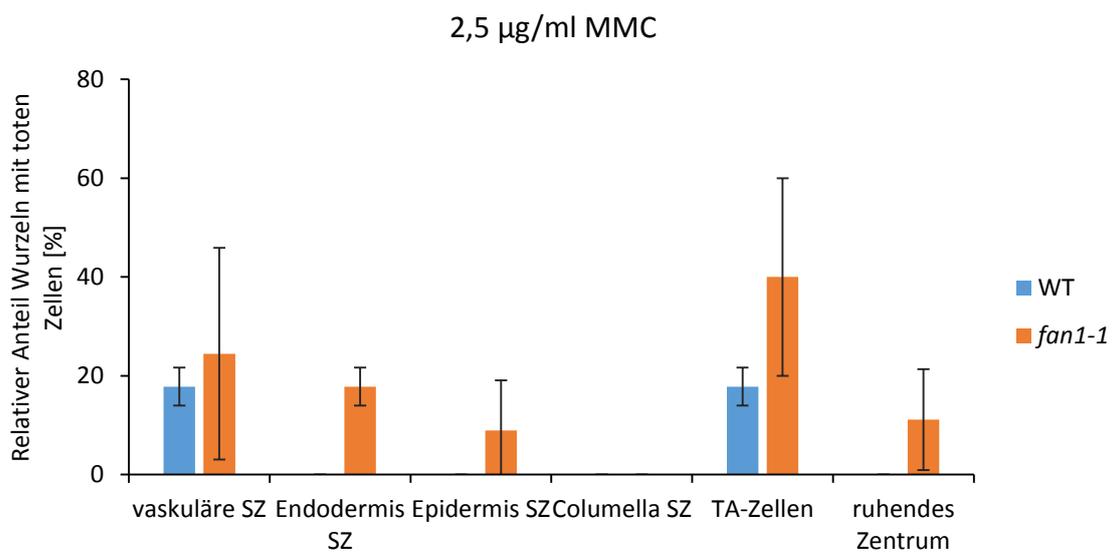


Abbildung 3.27: Zelltod in WT und *fan1-1* Wurzeln nach Behandlung mit 2,5 µg/ml MMC. Die Legende befindet sich auf der folgenden Seite.

Abbildung 3.27: Zelltod in WT und *fan1-1* Wurzeln nach Behandlung mit 2,5 µg/ml MMC. Abb. auf vorheriger Seite.

(A) Beispielbilder gefärbter Wurzeln im Wildtyp (WT) (oben) und in der *fan1-1* Mutante (unten) nach Behandlung mit 2,5 µg/ml MMC. (B) Auswertung der gefärbten Wurzeln im Grundzustand. Die Anzahl vaskulärer Stammzellen (SZ) im WT und in der Mutante waren vergleichbar. In der *fan1-1* Mutante war der Anteil an Wurzeln, die tote TA-Zellen aufwiesen, doppelt so hoch wie im WT. In der *fan1-1* Mutante wurden außerdem noch tote Endodermis und Epidermis SZ, sowie tote Zellen im ruhenden Zentrum beobachtet. Maßstab = 20 µm.

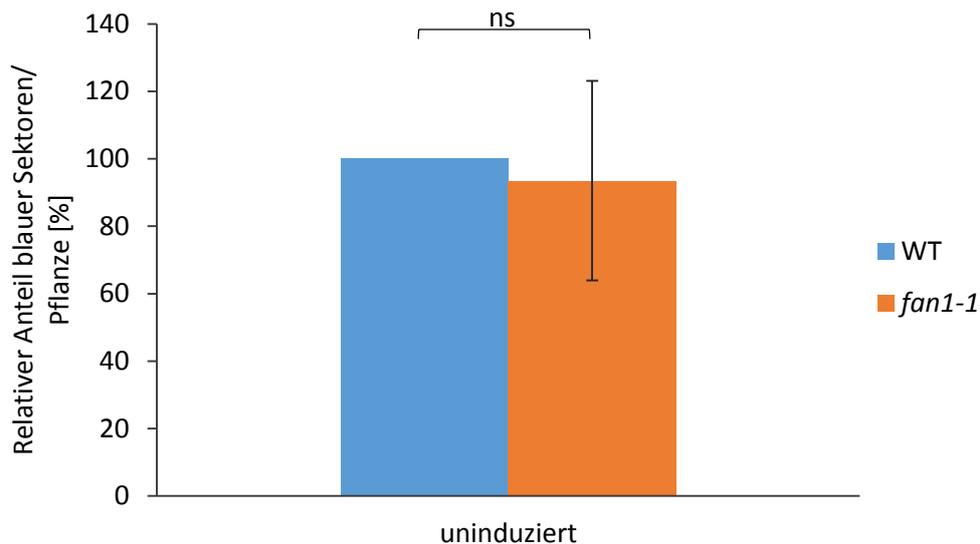


Abbildung 3.28: Spontane Rekombinationsrate der Einzelmutanten *fan1-1*.

Zur Ermittlung der Rekombinationsrate wurde die Einzelmutante im IC9 Reporterhintergrund untersucht und anschließend die spontane Rekombinationsrate bestimmt. Anhand des getesteten Wildtyps (WT) konnte der relative Anteil blauer Sektoren pro Pflanze ermittelt werden. Die Einzelmutante besaß eine im Vergleich zum Wildtyp vergleichbare spontane Rekombinationsrate. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet. ns = nicht signifikant.

im Vergleich zum relativen Frischgewicht beider Einzelmutanten. Das relative Frischgewicht der *fan1-1* Einzelmutante lag zwischen 70 und 40 %, wohingegen sich das der *mus81-1* Einzelmutante zwischen 40 und 30 % befand. In höheren Konzentrationen war das relative Frischgewicht der Doppelmutante mit 20 und 15 % vergleichbar mit dem der *fan1-1* Einzelmutante, allerdings immer noch signifikant verschieden im Vergleich mit *mus81-1*.

Auch die Doppelmutante *fan1-1 rad5A-2* wurde auf ihre Sensitivität gegenüber MMC untersucht. Wie in vorherigen Experimenten wurden die Doppelmutante, beide Einzelmutanten und der Wildtyp für zwei Wochen mit verschiedenen Konzentrationen MMC inkubiert und das Frischgewicht bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle berechnet. Der Mittelwert des relativen Frischgewichts wurde berechnet und wie auch zuvor, in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.31)

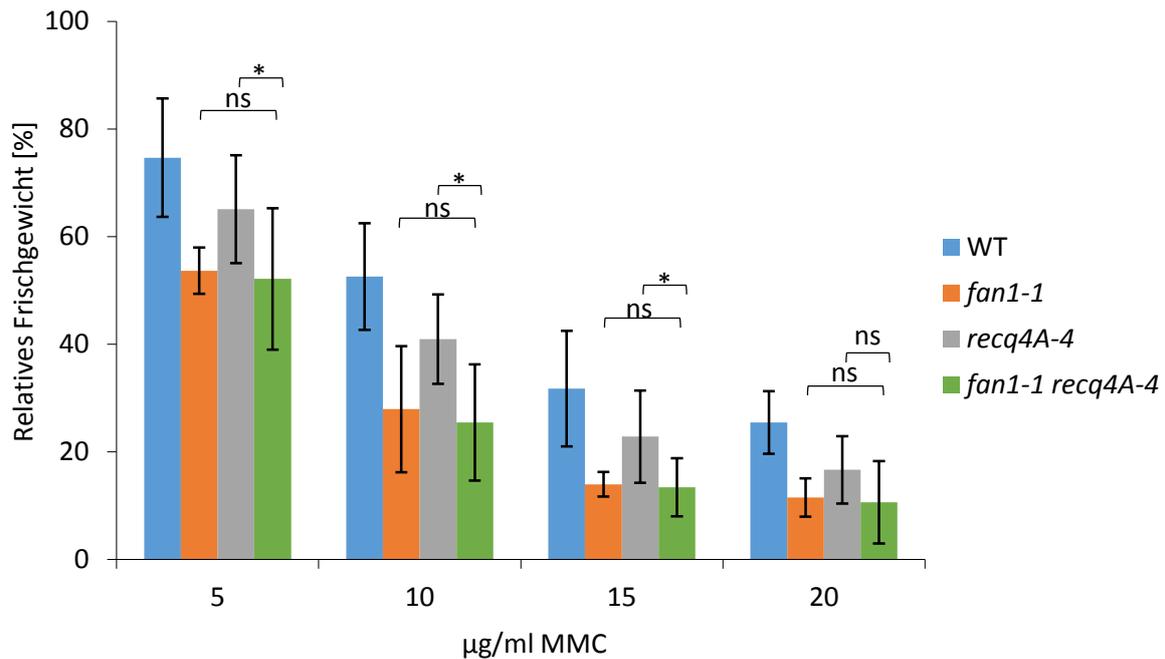


Abbildung 3.29: Relatives Frischgewicht der *fan1-1 recq4A-4* Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutanten *fan1-1*, *recq4A-4*, die Doppelmutante *fan1-1 recq4A-4*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. In allen getesteten Konzentrationen zeigte *fan1-1 recq4A-4* ein vergleichbares und nicht signifikant verschiedenes relatives Frischgewicht zur *fan1-1* Einzelmutante auf. Das relative Frischgewicht der Doppelmutante im Vergleich zur *recq4A-4* Einzelmutante ist bei 5, 10 und 15 µg/ml MMC signifikant verschieden. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*). ns = nicht signifikant.

Das relative Frischgewicht der *fan1-1 rad5A-2* Doppelmutante war nach der Behandlung mit 5 und 10 µg/ml MMC signifikant verschieden vom relativen Frischgewicht von *fan1-1*, allerdings vergleichbar mit dem der *rad5A-2* Einzelmutante. Das relative Frischgewicht von *fan1-1* betrug bei 5 und 10 µg/ml 70 beziehungsweise 40 %, wohingegen das relative Frischgewicht der *rad5A-2* Einzelmutante und der Doppelmutante mit *fan1-1* etwa 40 beziehungsweise 20 % betrug. In den beiden höheren MMC Konzentrationen betrug das relative Frischgewicht der beiden Einzelmutanten und der Doppelmutante nur noch etwa 20 %. Aufgrund der Tatsache, dass FAN1 und MHF1 im Verdacht stehen in Säugern zusammen im FA-Signalweg zu agieren, wurde wie bereits weiter oben beschrieben auch die Doppelmutante aus *fan1-1* und *mhf1-1* auf ihre Sensitivität gegenüber MMC untersucht. Wie in vorherigen Experimenten wurden die Doppelmutante, beide Einzelmutanten und der Wildtyp für zwei Wochen mit verschiedenen Konzentrationen an MMC inkubiert und das Frischgewicht bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle berechnet. Der Mittelwert des relativen Frischgewichts wurde berechnet und in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.32). In allen getesteten Konzentrationen war das relative Frischgewicht von *fan1-1 mhf1-1*

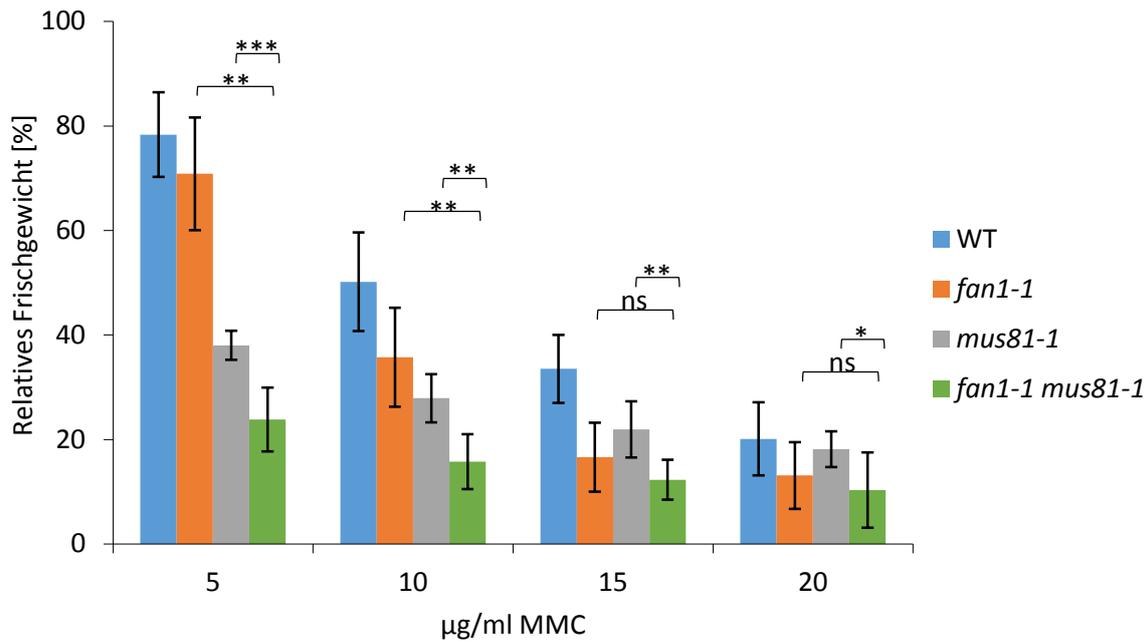


Abbildung 3.30: Relatives Frischgewicht der *fan1-1 mus81-1* Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutanten *fan1-1*, *mus81-1*, die Doppelmutante *fan1-1 mus81-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Bei 5 und 10 µg/ml MMC zeigte die Doppelmutante ein zu beiden Einzelmutanten signifikant vermindertes Frischgewicht auf. Auch bei 15 und 20 µg/ml war das relative Frischgewicht der Doppelmutante im Vergleich zur *mus81-1* Einzelmutante verschieden. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*); p-Wert $< 0,01$ (**); p-Wert $< 0,001$ (***). ns = nicht signifikant.

vergleichbar mit der *fan1-1* Einzelmutante und betrug zwischen 65 und 30 %. Im Vergleich zur *mhf1-1* Einzelmutante, die ein relatives Frischgewicht zwischen 100 und 70 % aufwies, zeigte die Doppelmutante in allen getesteten Konzentrationen ein signifikant vermindertes relatives Frischgewicht auf.

Wie die anderen Doppelmutanten wurde auch die *fan1-1 fancjb-1* Doppelmutante auf ihre Sensitivität gegenüber MMC untersucht. Dazu wurde die Doppelmutante, beide Einzelmutanten und der Wildtyp für zwei Wochen mit verschiedenen Konzentrationen MMC inkubiert und das Frischgewicht bestimmt. Das relative Frischgewicht in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 3.33). Das relative Frischgewicht der *fan1-1 fancjb-1* Doppelmutante war vergleichbar mit dem relativen Frischgewicht der beiden Einzelmutanten und lag zwischen 60 und 20 % der unbehandelten Kontrolle.

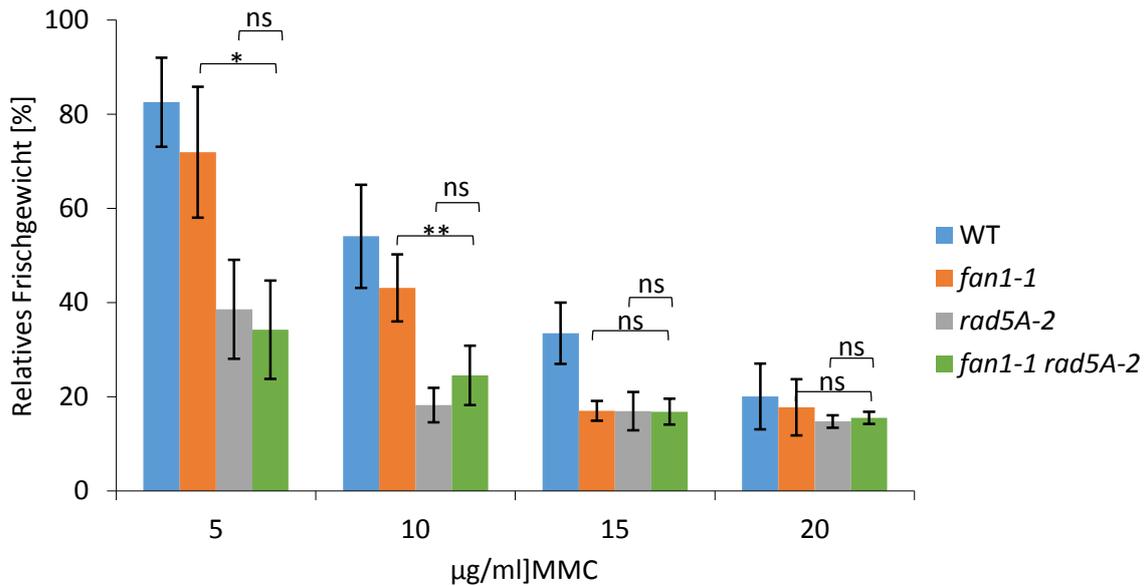


Abbildung 3.31: Relatives Frischgewicht der *fan1-1 rad5A-2* Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutanten *fan1-1*, *rad5A-2*, die Doppelmutante *fan1-1 rad5A-2*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Bei 5 und 10 µg/ml MMC zeigte die Doppelmutante ein zu *fan1-1* signifikant vermindertes und ein zu *rad5A-2* vergleichbares relatives Frischgewicht auf. Bei 15 und 20 µg/ml betrug war das relative Frischgewicht der drei Mutanten vergleichbar. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*); p-Wert $< 0,01$ (**). ns = nicht signifikant.

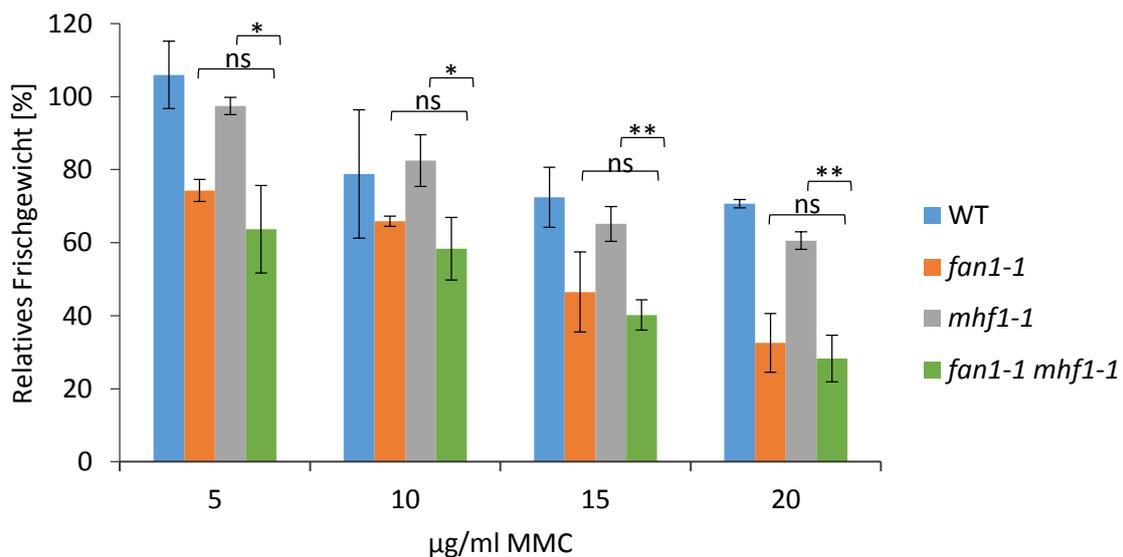


Abbildung 3.32: Relatives Frischgewicht der *fan1-1 mhf1-1* Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Legende befindet sich auf der folgenden Seite.

Abbildung 3.32: Relatives Frischgewicht der *fan1-1 mhfl-1* Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC). Abb. auf vorheriger Seite.

Die Einzelmutanten *fan1-1*, *mhfl-1*, die Doppelmutante *fan1-1 mhfl-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Bei allen getesteten Konzentrationen zeigte die Doppelmutante ein zu *fan1-1* vergleichbares relatives Frischgewicht auf, wohingegen die Doppelmutante zu *mhfl-1* ein signifikant vermindertes relatives Frischgewicht aufwies. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem T-Test mit ungleicher Varianz berechnet und im Diagramm gekennzeichnet: p-Wert $\leq 0,05$ (*); p-Wert $< 0,01$ (**). ns = nicht signifikant.

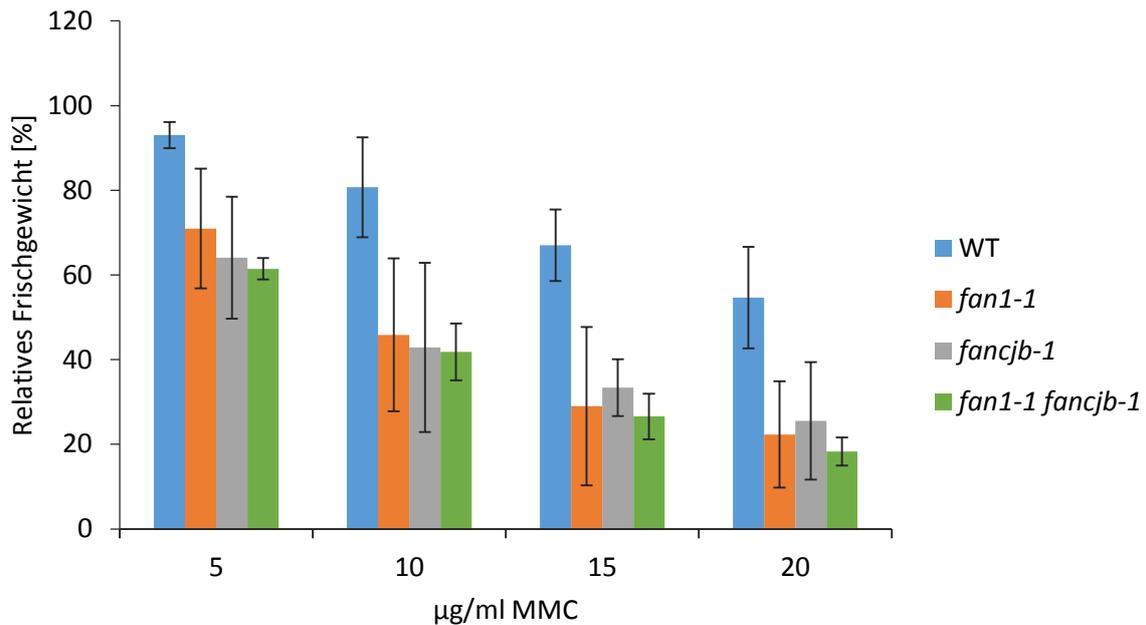


Abbildung 3.33: Relatives Frischgewicht der *fan1-1 fancjb-1* Doppelmutante gegenüber Mitomycin C (MMC).

Die Einzelmutanten *fan1-1*, *fancjb-1*, die Doppelmutante *fan1-1 fancjb-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Bei allen getesteten Konzentrationen zeigte die Doppelmutante ein zu *fan1-1* und *fancjb-1* vergleichbares relatives Frischgewicht auf. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 Identifikation von MHF1 in *Arabidopsis thaliana*

Interstrang-CLs stellen eine der schwerwiegendsten Form von DNA-Schäden dar, da durch die Verknüpfung zweier DNA-Stränge die Dissoziation der Stränge in zellulären Prozessen wie Replikation oder Transkription inhibiert wird. Um dies zu verhindern, ist der Fanconi Anämie-Signalweg in Säugern zur Beseitigung solcher Interstrang-CLs evolviert. Der initiale Schritt des Signalwegs stellt die Erkennung und anschließende Bindung des DNA-Schadens durch FANCM dar. Das Heterodimer MHF, welches sich aus den Proteinen MHF1 und MHF2 zusammensetzt, ist involviert in die korrekte DNA-Bindung von FANCM. MHF ist, ebenso wie FANCM, evolutionär gesehen stark konserviert und hat Homologe sowohl in Säugern, als auch in Hefe. In *Arabidopsis thaliana* ist ebenfalls ein Homolog zum menschlichen MHF1 vorhanden, welches im Rahmen dieser Arbeit durch BLAST-Analysen mit der menschlichen MHF1 Sequenz identifiziert werden konnte. Ebenso wie HsMHF1 besitzt das Protein in *Arabidopsis* eine *histone-fold-like* Domäne, die auch als CENP-S Domäne bezeichnet wird. Ein Alignment der Proteinsequenzen von HsMHF1, ScMhf1 und AtMHF1 konnte zeigen, dass einige, für die Interaktion von MHF1 mit MHF2, essentielle Aminosäuren konserviert vorliegen (Abbildung 3.1). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch in *Arabidopsis* MHF1 eine Interaktion mit MHF2 eingeht und ein Heterodimer ausbildet.

4.1.1 Charakterisierung zweier Insertionsmutanten von *AtMHF1*

Zur Charakterisierung von MHF1 in *Arabidopsis* wurden die T-DNA Insertionsmutanten *mhf1-1* (SALK_119435; Alonso *et al.*, 2003) und *mhf1-2* (WiscDsLox5070A09; Woody *et al.*, 2007) verwendet. Der Integrationsort der T-DNA innerhalb der *mhf1-1* Linie konnte sequenzgenau bestimmt werden. Die T-DNA Integration konnte in Exon 1 festgestellt werden (Abbildung 3.2). Die T-DNA in der Mutantenlinie *mhf1-2* befindet sich vor dem Start-ATG im 5' UTR-Bereich. Der Integrationsort der T-DNA konnte in *mhf1-2* nur 3' der Insertion sequenzgenau bestimmt werden. Das 5' Ende konnte nicht exakt bestimmt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es während der Integration der T-DNA zu größeren Deletionen oder Insertionen im Rahmen des 5' Endes der T-DNA kam, wodurch dieses mit den verwendeten Primern nicht exakt bestimmt werden konnte. Befindet sich eine T-DNA Insertion innerhalb eines Introns, könnte diese während des Spleißvorgangs entfernt werden. In *mhf1-1* liegt die T-DNA innerhalb eines Exons und wird daher wahrscheinlich nicht durch Spleißen aus MHF1

entfernt. Dennoch könnten Bereiche des Gens, die nicht durch die T-DNA unterbrochen sind, exprimiert werden und ein Teilprotein bilden. In *mhfl-2* hingegen befindet sich der Integrationsort der T-DNA noch vor Beginn des Start-ATGs, was dazu führen könnte, dass die Expression des Gens durch die T-DNA nicht inhibiert wird. Lediglich wenn sich die T-DNA Insertion innerhalb regulatorischer Bereiche wie etwa dem Promotor befindet, könnte die Expression von *MHF1* gestört werden. Um zu überprüfen, ob die Expression von *MHF1* in den Mutanten *mhfl-1* und *mhfl-2* verändert ist, wurden Expressionsanalysen mit spezifischen Primerkombinationen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Primer konnte entweder ein Produkt über die T-DNA Insertion oder 3' der Integration zu amplifiziert werden. Wäre die Expression von *MHF1* durch die T-DNA Insertion gestört, so würde keine Expression gemessen werden. Da sich 5' der T-DNA in beiden Mutanten nur wenige Nukleotide befanden, konnte die Expression 5' der T-DNA Insertion nicht bestimmt werden. Über die T-DNA konnte in *mhfl-1* und *mhfl-2* im Vergleich zum Wildtyp keine oder nur eine sehr geringe Restexpression von *MHF1* detektiert werden (Abbildung 3.3). 3' der Insertion kam es in *mhfl-1* zu einer im Vergleich zum Wildtyp sechsfach erhöhten Expression des Gens. *mhfl-1* ist demnach keine Nullmutante, da nach der T-DNA Insertion eine Expression von *MHF1* zu messen war, was zur Bildung eines Teilproteins führen könnte. Dieses Teilprotein wäre zwar im Vergleich zum Wildtyp stark verkürzt, könnte aber dennoch Funktionen innerhalb der Zelle übernehmen. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Phänotypen in *mhfl-1* wirklich auf das Fehlen des *MHF1* Gens zurückzuführen waren, können zum einen Komplementationsanalysen durchgeführt werden. Dabei würde untersucht werden, ob die beobachteten Phänotypen in *mhfl-1* durch Einbringen des Wildtyp *MHF1* Gens wieder aufgehoben und damit komplementiert werden könnten. Wäre dies der Fall, so könnte schlussgefolgert werden, dass der beobachtete Defekt in der *mhfl-1* Mutante wirklich auf die Mutation des *MHF1* Gens zurückzuführen ist. Eine weitere Möglichkeit, dies zu überprüfen, ist die Untersuchung einer zweiten *mhfl* Mutante, was im Rahmen dieser Arbeit durch Analyse von *mhfl-2* durchgeführt wurde. Zeigt *mhfl-2* den gleichen Phänotyp wie *mhfl-1*, so sind die Defekte sehr wahrscheinlich auf die Mutation von *MHF1* zurückzuführen. Auch in *mhfl-2* wurde die Expression 3' der T-DNA Insertion getestet. Es konnte eine zum Wildtyp vergleichbare Expression gemessen werden. Demnach ist *mhfl-2* ebenfalls keine Nullmutante, da auch hier die Expression 3' der T-DNA zu einem Teilprotein führen könnte. Allerdings zeigten die beiden Mutanten *mhfl-1* und *mhfl-2* die gleichen Defekte (siehe Abschnitte 3.1.2, 3.1.3 und 3.1.4), weshalb davon auszugehen ist, dass die beobachteten Phänotypen wirklich auf die Mutation von *MHF1* zurückzuführen sind.

4.1.2 Die Funktion von AtMHF1 in der DNA Reparatur

In Säugern bildet MHF1 zusammen mit seinem Interaktionspartner MHF2 einen Komplex aus, der die korrekte Bindung von FANCM an den DNA Interstrang-CL unterstützt. Ebenso wie die Mutation der *FANC*-Gene, führt auch die Mutation von *MHF1* in Säugern zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen

gegenüber Interstrang-CL induzierenden Agenzien (Singh *et al.*, 2010). In Hefe liegt Mhf1 ebenfalls konserviert vor, allerdings scheint Mhf1 hierbei in die Reparatur MMS-induzierter Schäden involviert zu sein (Yan *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von AtMHF1 in der DNA Reparatur untersucht, indem die Mutanten *mhf1-1* und *mhf1-2* auf eine erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedenen Genotoxinen überprüft wurden. In beiden Mutanten konnte keine Hypersensitivität gegenüber den getesteten Genotoxinen beobachtet werden. Insbesondere konnte auch keine erhöhte Sensitivität gegenüber MMS (Anhang Tabelle 8.9), welches zu Methylierungen an der DNA führt und ebenfalls nicht gegenüber den CL-induzierenden Agenzien *cis*-Platin (Anhang Tabelle 8.7) und MMC (Abbildung 3.4) beobachtet werden. Diese Tatsache konnte bereits zuvor für das Homolog von FANCM in Arabidopsis festgestellt werden, da auch *fancm* Einzelmutanten keine Hypersensitivität gegenüber verschiedener DNA Schäden aufwiesen (Knoll *et al.*, 2012). Demnach wäre anzunehmen, dass sowohl AtMHF1, als auch AtFANCM, ungleich ihren Homologen in anderen Organismen, nicht in die Reparatur von DNA Schäden involviert sind. In *Arabidopsis thaliana* konnte bereits gezeigt werden, dass die Proteine RECQ4A, MUS81 und RAD5A in die Reparatur von Intrastrang-CL, induziert durch *cis*-Platin, involviert sind (Hartung *et al.*, 2006; Hartung *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008). Ebenso wurde festgestellt, dass diese dabei in unabhängigen Reparaturwegen agieren (Mannuss *et al.*, 2010). Für die Reparatur von Interstrang-CLs konnte eine Beteiligung von MUS81 und RAD5A, ebenfalls in parallelen Signalwegen, gezeigt werden (Mannuss *et al.*, 2010). Für RECQ4A wurde bisher noch keine Funktion innerhalb der Interstrang-CL Reparatur beschrieben. Für die Einzelmutanten von *mhf1* in Arabidopsis konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie keine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Interstrang-CL induzierenden Agens MMC aufwiesen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass MHF1 eine untergeordnete Rolle innerhalb dieser Reparatur spielt, die nur aufgedeckt werden kann, falls eines der wichtigen CL-Gene fehlt. Aus diesem Grund wurden Doppelmutanten mit *mhf1-1* und den Mutanten der Gene *AtRECQ4A*, *AtMUS81* und *AtRAD5A* hergestellt und auf ihre Sensitivität gegenüber MMC untersucht.

Interessanterweise konnte eine additive Sensitivität der Doppelmutante *mhf1-1 recq4A-4* im Vergleich zu beiden Einzelmutanten und dem Wildtyp nach Behandlung mit 10 und 15 µg/ml MMC detektiert werden (Abbildung 3.5). Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur MHF1, sondern auch RECQ4A in Arabidopsis eine Funktion innerhalb der Interstrang-CL Reparatur übernehmen, was erstmals gezeigt werden konnte (Dangel *et al.*, 2014). Aufgrund der im Vergleich zum Wildtyp und zu den Einzelmutanten stärkeren Sensitivität der Doppelmutante kann ebenfalls interpretiert werden, dass MHF1 und RECQ4A im Rahmen der Interstrang-CL Reparatur in parallelen Signalwegen agieren müssen. Die Einzelmutante *Atfancm* zeigte ebenfalls keine Hypersensitivität gegenüber MMC auf (Knoll *et al.*, 2012). Um zu überprüfen, ob die Mutation von *FANCM* und *RECQ4A* in Arabidopsis ebenfalls zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber MMC führt, wurde auch die Doppelmutante *fancm-1 recq4A-4* bezüglich ihrer MMC Sensitivität untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass diese,

ebenso wie die *mhf1-1 recq4A-4* Doppelmutante, auch eine additive Sensitivität gegenüber MMC im Vergleich zum Wildtyp und zu beiden Einzelmutanten aufwies (Dangel *et al.*, 2014). Demnach übernimmt FANCM, wie auch MHF1, in Arabidopsis eine Funktion in der Reparatur von Interstrang-CLs und agiert dabei in einem parallelen Signalweg zu der RecQ-Helikase RECQ4A. Im Menschen konnte gezeigt werden, dass die RecQ-Helikase BLM, die das funktionelle Homolog zu AtRECQ4A darstellt, mit ubiquitiniertem FANCD2 interagiert und mit diesem an DNA Interstrang-CLs zur Reparatur colokalisiert (Pichierri *et al.*, 2004; Hirano *et al.*, 2005). Außerdem konnte eine Interaktion des menschlichen FANCM Proteins mit dem BLM-Komplex nachgewiesen werden (Deans und West, 2009; Hoadley *et al.*, 2012), der sich aus der BLM-Helikase, einer Typ IA Topoisomerase und den zwei Strukturproteinen RMI1 und 2 zusammensetzt. Erst kürzlich konnte eine ähnliche Interaktion im Seidenspinner (*Bombyx mori*) gezeigt werden, wobei FancM mit Mhf und Rmi1 des BLM-Komplexes ebenfalls interagiert (Sugahara *et al.*, 2014). Für Arabidopsis FANCM und MHF1 konnte solch eine Interaktion mit RECQ4A innerhalb der Interstrang-CL Reparatur bisher nicht nachgewiesen werden. In Pflanzen scheint die Situation eine andere zu sein. AtMHF1, AtFANCM und AtRECQ4A sind zwar alle, wie die Ergebnisse innerhalb dieser Arbeit zeigten, in die Reparatur von Interstrang-CLs involviert, allerdings scheinen MHF1 und FANCM dabei beide unabhängig von RECQ4A zu agieren (Dangel *et al.*, 2014).

2012 konnte gezeigt werden, dass die Mutation von *FANCM* und *MUS81* in *Arabidopsis thaliana* zur Letalität führt (Crismani *et al.*, 2012), was 2014 bestätigt wurde (Dangel *et al.*, 2014). Überraschenderweise wies die Doppelmutante aus *mhf1-1* und *mus81-1* keine Wachstumsdefekte auf. Falls AtFANCM und AtMHF1 wie auch im Menschen immer gemeinsam agieren, sollte *mhf1-1 mus81-1* ebenfalls einen letalen Phänotyp aufweisen. Die Doppelmutante aus *mhf1-1* und *mus81-1* war aber lebensfähig und wies ein zur *mus81-1* Einzelmutante vergleichbares relatives Frischgewicht auf (Abbildung 3.6). Die *mhf1-1* Einzelmutante zeigte keine erhöhte Sensitivität, was zunächst dafür sprechen würde, dass MHF1 nicht an dieser Reparatur beteiligt ist. Da jedoch durch Analyse der *mhf1-1 recq4A-4* Doppelmutante eine Funktion für MHF1 innerhalb der Interstrang-CL Reparatur nachgewiesen werden konnte, spricht das Ergebnis der *mhf1-1 mus81-1* Doppelmutante dafür, dass AtMHF1 und AtMUS81 in einem gemeinsamen Signalweg zur Reparatur von Interstrang-CLs agieren. Im Hinblick auf die Tatsache, dass die Doppelmutante aus *fancm* und *mus81* nicht lebensfähig war, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob sie möglicherweise in einem gemeinsamen oder in parallelen Signalwegen zur Reparatur von Interstrang-CLs fungieren (Dangel *et al.*, 2014). Die Nuklease MUS81 bildet zusammen mit EME1 einen hochkonservierten Endonukleasekomplex aus, der in die Auflösung verschiedener DNA-Intermediate involviert ist, die während der Reparatur von DNA Schäden auftreten können. Interessanterweise wurde MUS81 auch eine Funktion innerhalb der CL Reparatur im Menschen nachgewiesen, wobei MUS81 an der Exzision des *Crosslinks* zur Generierung von DSBs beteiligt ist (Hanada *et al.*, 2006; Hanada *et al.*, 2007) und dabei eine Rolle innerhalb des

FA-Signalwegs spielt. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuteten ebenfalls auf ein Zusammenspiel zumindest von dem im Menschen Fanconi Anämie-assoziierten Protein MHF1 und der Nuklease MUS81 hin (Dangel *et al.*, 2014).

Ein weiteres Protein, welches in die Reparatur von CL in Arabidopsis involviert ist, ist die ATPase RAD5A. Rad5 in Hefe übernimmt wichtige Funktionen innerhalb der PRR, wobei es die Regression von Replikationsgabeln katalysiert (Blastyak *et al.*, 2007). Rad5 ist auch an der Polyubiquitinierung des Ringklemmenproteins PCNA beteiligt. Für AtRAD5A konnte unter anderem eine Funktion innerhalb der Reparatur von Interstrang-CLs nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2008). Um auch hierbei zu untersuchen, wie sich MHF1 und RAD5A zueinander verhalten, wurde die Doppelmutante aus *mhf1-1* und *rad5A-2* bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber MMC untersucht. Die Auswertung der Sensitivitätstests ergab dabei, dass die Doppelmutante eine mit der *rad5A-2* Einzelmutante vergleichbare Hypersensitivität im Vergleich zum Wildtyp aufwies (Abbildung 3.7). Dies lässt darauf schließen, dass AtMHF1 nicht nur in den Signalweg von AtMUS81, sondern auch in den RAD5A-abhängigen Reparaturweg zur Beseitigung von Interstrang-CLs involviert ist.

In Säugern agieren FANCM und MHF1 zusammen, damit eine korrekte Bindung von FANCM an den Interstrang-CL stattfinden kann. In Hefe führt die Mutation von *MPH1* (dem Homolog von HsFANCM) oder die Mutation von *MHF1* zu einer Hypersensitivität gegenüber Schäden, die durch das Genotoxin MMS induziert werden (Scheller *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010), was ebenfalls eine Zusammenarbeit der beiden Proteine bezüglich dieser Reparatur vermuten lässt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits eine Funktion von MHF1 in der Interstrang-CL Reparatur in Arabidopsis nachgewiesen werden, die auch für FANCM gezeigt werden konnte (Dangel *et al.*, 2014). Beide agieren dabei ebenfalls parallel zur RecQ-Helikase RECQ4A. Um zu überprüfen, ob AtMHF1 und AtFANCM in einem gemeinsamen Signalweg agieren, wurde die Doppelmutante aus *mhf1-1* und *fanm-1* auf ihre Sensitivität gegenüber dem Genotoxin MMC hin untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass sowohl beide Einzelmutanten, als auch die Doppelmutante ein zum Wildtyp vergleichbares relatives Frischgewicht aufwiesen (Abbildung 3.8). Eine im Vergleich zu beiden Einzelmutanten additive Sensitivität würde auf ein Agieren der beiden Proteine in parallelen Signalwegen schließen lassen. Da jedoch das relative Frischgewicht der Doppelmutante zu dem der Einzelmutanten ähnlich ist, lässt dies vermuten, dass AtMHF1 und AtFANCM, wie auch in Säugern, in einem gemeinsamen Signalweg zur Reparatur von Interstrang-CLs agieren.

FANCI zählt in Säugern zu den *FANCI*-Genen und ist dadurch ebenfalls an der Reparatur von Interstrang-CLs beteiligt. In Arabidopsis sind zwei Homologe von FANCI zu finden, die als FANCIJA und FANCIJB bezeichnet wurden (vgl. Abschnitt 1.4.3). Insbesondere für AtFANCIJB konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass es ebenfalls in die Interstrang-CL Reparatur involviert ist und dabei epistatisch zu AtRECQ4A und zu AtRAD5A agiert (Köhler, 2014). Weiterhin konnte festgestellt

werden, dass AtFANCJB und AtMUS81 in parallelen Signalwegen agieren. Um das Zusammenspiel von MHF1 und FANCJB in *Arabidopsis* genauer zu untersuchen, wurde die Doppelmutante aus *mhf1-1* und *fancjb-1* auf ihre Sensitivität gegenüber MMC hin untersucht. Wie zu erwarten, zeigte die *mhf1-1* Einzelmutante keine erhöhte Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp. Die bereits analysierte Hypersensitivität von *fancjb-1* gegenüber MMC (Köhler, 2014) konnte bestätigt werden. Das relative Frischgewicht der dazugehörigen Doppelmutante *mhf1-1 fancjb-1* war vergleichbar mit dem der *fancjb-1* Einzelmutante (Abbildung 3.9). Dieses Ergebnis führt schließlich zu der Annahme, dass AtMHF und AtFANCJB, ähnlich wie die Situation in Säugern, in einem gemeinsamen Signalweg zur Reparatur von Interstrang-CLs agieren.

Durch die Untersuchung verschiedener Doppelmutanten bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber einem Genotoxin lassen sich die dazugehörigen Proteine besser in den Ablauf dieser Reparatur oder in mögliche Reparaturwege einordnen. Nur durch die Untersuchung der *mhf1-1 recq4A-4* Doppelmutante konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Funktion von AtMHF1 und auch für AtRECQ4A innerhalb der Reparatur von Interstrang-CLs detektiert werden (Dangel *et al.*, 2014). Auch für AtFANCM wurde nur durch Untersuchung der *fancm-1 recq4A-4* Doppelmutante eine Beteiligung an der Reparatur von Interstrang-CLs nachgewiesen (Dangel *et al.*, 2014). In beiden Fällen zeigten die Doppelmutanten eine im Vergleich zu den Einzelmutanten additive Sensitivität, was auf eine Funktion von MHF1 und FANCM in einem RECQ4A-unabhängigen Weg hindeutet. Eine ähnliche Entdeckung konnte für die Homologe von MHF1 und FANCM in Hefe gemacht werden. Wie bereits weiter oben beschrieben, zeigen die Einzelmutanten von *mhf1* und *fancm* in Hefe keine erhöhte Sensitivität gegenüber Interstrang-CLs. Wird jedoch in den Einzelmutanten zusätzlich *SRS2* mutiert, so ist eine stärkere Hypersensitivität der Doppelmutanten im Vergleich zur *srs2* Einzelmutante zu finden (Dae *et al.*, 2012). *Srs2* ist eine DNA-Helikase, die auch als Antirekombinase bezeichnet wird, da sie die Entstehung von CO während der HR unterdrückt. Dae und Kollegen postulieren, dass *Srs2* und *Mph1* redundante Funktionen innerhalb der Interstrang-CL Reparatur in Hefe übernehmen könnten, da beide HR-inhibierende Funktionen aufweisen (Dae *et al.*, 2012). *Srs2* blockiert die Bildung von RAD51-Filamenten (Krejci *et al.*, 2003), die essentiell für den Ablauf der HR sind, wohingegen *Mph1* blockierte Replikationsgabeln stabilisiert und dadurch eine frühzeitige Reparatur möglicher entstehender DSBs durch HR verhindert. Für *ScMhf1* wurde in diesem Zusammenhang herausgefunden, dass es epistatisch zu *ScMph1* innerhalb der Interstrang-CL Reparatur agiert und daher wahrscheinlich, ebenso wie in Säugern, auch für die Bindung von *Mph1* an den DNA-Schaden wichtig ist (Dae *et al.*, 2012). Auch in *Arabidopsis thaliana* liegt die Helikase SRS2 konserviert vor, allerdings konnten ihr bisher noch keine Funktionen nachgewiesen werden (Knoll, 2011). Da diese Antirekombinase nicht in allen Organismen konserviert vorliegt, wird angenommen, dass in diesen die Helikase RTEL1 das funktionelle Analog ist. Interessanterweise liegt in *Arabidopsis* auch ein Homolog zu RTEL1 vor, dem Funktionen auch als Antirekombinase in der Unterdrückung der homologen Rekombination

nachgewiesen wurden (Knoll, 2011). Um zu überprüfen, ob FANCM und MHF1 möglicherweise redundante Funktionen zu RTEL1 in *Arabidopsis* übernehmen, sollen in nachfolgenden Arbeiten die Doppelmutanten generiert und untersucht werden. AtRECQ4A stellt ebenfalls eine Helikase dar, die in die Unterdrückung somatischer homologer Rekombinationsereignisse involviert ist (Hartung *et al.*, 2007). Ähnlich wie in Hefe, könnten auch AtRECQ4A und AtFANCM/AtMHF1 beide ebenfalls redundante Funktionen innerhalb der Interstrang-CL Reparatur übernehmen, die erst zu einem sichtbaren Mutantenphänotyp führen, wenn beide Gene mutiert wurden. Die Untersuchung der *mhf1-1 fancm-1* Doppelmutante ergab, dass AtMHF1 und AtFANCM, wie auch bei Säugern und in Hefe, in einem gemeinsamen Reparaturweg zu Beseitigung von Interstrang-CLs in *Arabidopsis* agieren. Da auch in *Arabidopsis* MHF1 eine *histone-fold-like* Domäne aufweist, könnte AtMHF1 in Pflanzen ebenfalls in die korrekte Erkennung und Bindung von AtFANCM an den DNA-Schaden beteiligt sein. Die Analyse der *mhf1-1 mus81-1* Doppelmutante deutete darauf hin, dass MHF1 im gleichen Signalweg wie die Nuklease MUS81 agiert. Da die Doppelmutante aus *fancm* und *mus81* nicht lebensfähig war (Crismani *et al.*, 2012; Dangel *et al.*, 2014), konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob FANCM ebenfalls im gleichen Signalweg wie MUS81 involviert ist. Im Hinblick auf die Tatsache, dass MHF1 und FANCM wahrscheinlich im gleichen Signalweg agieren, wirft die Hypothese auf, dass sowohl MHF1, als auch FANCM, in einem gemeinsamen Signalweg mit MUS81 in *Arabidopsis thaliana* agieren. Neben der Rolle von FANCM in diesem Signalweg muss es jedoch noch weitere Funktionen innerhalb der Zelle ausüben, da die gleichzeitige Mutation von AtFANCM und AtMUS81 zur Letalität führt. Dadurch, dass die Pflanzen der *fancm-1 mus81-1* Doppelmutante kurz nach der Keimung der Samen abstarben, könnte es sein, dass sowohl FANCM, als auch MUS81, wichtige Funktionen innerhalb der Entwicklung der Pflanze übernehmen. Da die Einzelmutanten beide lebensfähig sind, könnte bei Mutation von FANCM oder MUS81 das jeweilig andere Protein diese Funktion möglicherweise kompensieren. Bereits gezeigt werden konnte, dass AtMUS81 und AtRAD5A in parallelen Signalwegen zur Beseitigung von Interstrang-CLs involviert sind (Mannuss *et al.*, 2010). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnenen Daten lassen auf eine Funktion von MHF1 nicht nur innerhalb des MUS81-abhängigen Reparaturwegs, sondern auch innerhalb des Signalwegs von RAD5A schließen. Studien in Hefe ergaben nicht nur, dass Mhf1 und das FANCM Homolog Mph1 eine Rolle innerhalb der Interstrang-CL Reparatur unabhängig von Srs2 übernehmen, sondern dass beide dabei epistatisch zu ScRad5 agieren (Dae *et al.*, 2012). Dae und Kollegen erstellten in diesem Zusammenhang ein hypothetisches Modell, das erklären könnte, wie Mph1/Mhf1 und Rad5 in Hefe in einem gemeinsamen Signalweg agieren: Trifft die Replikationsmaschinerie auf einen Interstrang-CL, wird die weiterführende Replikation zunächst blockiert. Nach Stehenbleiben der Replikationsgabel induziert Rad5 die Polyubiquitinierung des Ringklemmenproteins PCNA, was schließlich (indirekt) zur Rekrutierung von Mph1/Mhf1 an den DNA-Schaden führt (Dae *et al.*, 2012). Auch in *Arabidopsis* wird vermutet, dass RAD5A in die Polyubiquitinierung von PCNA involviert ist (Mannuss *et al.*, 2010), was ebenfalls zu der Hypothese führen könnte, dass AtRAD5A zuerst PCNA ubiquitiniert und

anschließend AtFANCM, zusammen mit AtMHF1, rekrutiert wird. Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit nur die Doppelmutante aus *mhf1* und *rad5A* in *Arabidopsis* untersucht. Ob FANCM ebenfalls in den RAD5A-abhängigen Reparaturweg zur Beseitigung von Interstrang-CLs beteiligt ist und ob hierbei MHF1 und FANCM zusammen agieren, soll in nachfolgenden Experimenten durch Analyse der *fancm-1 rad5A-2* Doppelmutante untersucht werden. Die Untersuchung der *mhf1-1 fancjb-1* Doppelmutante ergab, dass MHF1 auch in einem gemeinsamen Signalweg mit FANCB involviert ist. Für FANCB konnte, wie bereits beschrieben, eine Funktion innerhalb des RECQ4A-abhängigen und des RAD5A-abhängigen Interstrang-CL Reparaturwegs und parallel zum MUS81-abhängigen Weg gezeigt werden. Da MHF1 und FANCB beide in einem gemeinsamen Signalweg mit RAD5A zu agieren scheinen, könnte die vergleichbare Sensitivität der *mhf1-1 fancjb-1* Doppelmutante mit der der *fancjb-1* Einzelmutante damit erklärt werden, dass MHF1, FANCB und RAD5A alle in einem gemeinsamen Reparaturweg agieren. In Hefe konnte zwar kein direktes Homolog zu FANCB gefunden werden, allerdings existiert eine Helikase, die in die gleiche Familie wie FANCB eingeordnet werden konnte und zu FANCB homologe Bereiche aufwies. Es konnte gezeigt werden, dass diese Helikase, Chl1, in Hefe im Bereich der Interstrang-CL Reparatur epistatisch zu Mhf1 und auch zu Rad5 agiert, was ebenfalls auf einen gemeinsamen Signalweg hindeutet (Dae *et al.*, 2012). Ein hypothetisches Modell über das Zusammenspiel von MHF1 mit den untersuchten CL-Reparaturgenen in *Arabidopsis thaliana* ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

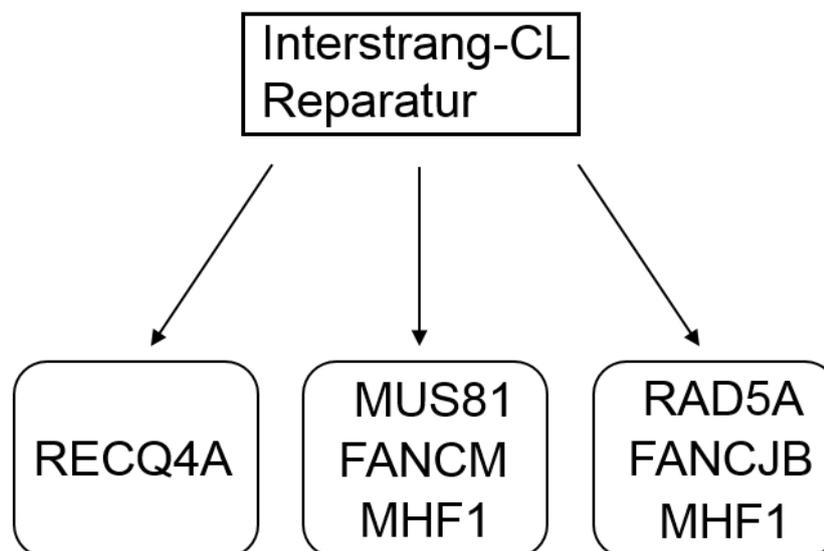


Abbildung 4.1: Modell über die Interstrang-Crosslink (CL) Reparaturwege mit Einordnung von MHF1 in *Arabidopsis thaliana*.

Die Abbildung zeigt ein hypothetisches Modell, das die verschiedenen Reparaturwege zur Beseitigung von Interstrang-CLs darstellt. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ergaben, dass MHF1 im gleichen Signalweg wie MUS81 und FANCM agiert und ebenfalls in den gleichen Reparaturweg wie RAD5A und FANCB involviert ist. Weiterhin agiert MHF1 parallel zu RECQ4A.

4.1.3 Die Funktion von AtMHF1 in der somatischen homologen Rekombination

Für MHF1 in Säugern wurde bisher noch keine Funktion innerhalb der somatischen homologen Rekombination beschrieben. Allerdings konnte für Mhf1 in Hefe gezeigt werden, dass es in die Entstehung von NCO Produkten involviert ist und dabei zusammen mit dem Homolog von FANCM, Fml1 interagiert (Bhattacharjee *et al.*, 2013). Auch für Arabidopsis FANCM konnte eine Funktion in der Unterdrückung von spontanen somatischen Rekombinationsereignissen innerhalb der Zelle nachgewiesen werden (Knoll *et al.*, 2012). Um zu überprüfen, ob AtMHF1 ebenfalls in den Prozess der somatischen homologen Rekombination involviert ist, wurden beide Einzelmutanten *mhf1-1* und *mhf1-2* mit der IC9 Reporterlinie gekreuzt und auf ihre somatische homologe Rekombinationsrate hin untersucht. In beiden Einzelmutanten konnte eine Reduktion der HR-Rate auf etwa die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abbildung 3.10). Dies lässt auf eine Funktion von AtMHF1 innerhalb der somatischen HR schließen. Im Gegensatz zu AtFANCM, scheint AtMHF1 allerdings die HR zu fördern, anstatt sie zu unterdrücken (Knoll *et al.*, 2012). Demnach übernehmen MHF1 und FANCM unterschiedliche Funktionen innerhalb der somatischen homologen Rekombination in *Arabidopsis thaliana*. Zur genaueren Charakterisierung der HR Funktion von AtMHF1 und um herauszufinden mit welchen anderen Proteinen MHF1 innerhalb dieser Funktion möglicherweise zusammenagiert, wurden einige der generierten und bereits durch Sensitivitätstests untersuchten Doppelmutanten auf ihre somatische homologe Rekombinationsrate untersucht.

Bereits überraschend war die Tatsache, dass AtMHF1 AtFANCM-unabhängige Funktionen in der DSB Reparatur durch HR übernimmt, da sich beide Einzelmutanten antagonistisch verhalten. Aus diesem Grund war es von besonderem Interesse, die Doppelmutante aus *mhf1-1* und *fanm-1* genauer zu untersuchen. Die Doppelmutante wurde dafür mit der IC9 Reporterlinie gekreuzt und anschließend auf ihre somatische homologe Rekombinationsrate hin untersucht. Die Rekombinationsrate der Doppelmutante war im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt und vergleichbar mit der der *mhf1-1* Einzelmutante (Abbildung 3.13). Demnach ist die zusätzliche Mutation von *MHF1* in der Lage, den Hyperrekombinationsphänotyp in *fanm* Mutanten zu unterdrücken. Wären MHF1 und FANCM in zwei verschiedenen HR-Signalwegen aktiv, wäre ein intermediärer Phänotyp in der Doppelmutante zu erwarten gewesen. Da jedoch die in dieser Arbeit beobachtete Rekombinationsrate der *mhf1-1 fanm-1* Doppelmutante der von *mhf1-1* gleicht, ist davon auszugehen, dass AtMHF1 und AtFANCM in einem gemeinsamen Weg innerhalb der HR agieren (Dangel *et al.*, 2014). Da der Rekombinationsphänotyp der *mhf1* Mutante in der Doppelmutante dominant zu sein scheint, ist MHF1 innerhalb dieser Reparatur wahrscheinlich vor FANCM aktiv.

Ähnlich wie MHF1, ist auch die Nuklease MUS81 in die somatische HR involviert und fördert diese (Hartung *et al.*, 2006). Falls MHF1 und MUS81 in Arabidopsis in einem gemeinsamen HR Signalweg agieren, sollte die Doppelmutante aus *mhf1-1* und *mus81-1* eine zu beiden Einzelmutanten vergleichbare Rekombinationsrate aufweisen. Sind beide in zwei unabhängigen Wegen aktiv, so sollte die Doppelmutante eine noch stärker reduzierte HR Rate zeigen. Die Analyse der *mhf1-1 mus81-1* Doppelmutante und beider Einzelmutanten ergab, dass sowohl die Einzelmutanten, als auch die Doppelmutante eine vergleichbare Reduktion der Rekombinationsrate im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Abbildung 3.12). Im Hinblick auf diese Tatsache ist anzunehmen, dass MHF1 und MUS81 in Arabidopsis in einem gemeinsamen Weg innerhalb der somatischen homologen Rekombination agieren (Dangel *et al.*, 2014).

Die RecQ-Helikase RECQ4A spielt ebenfalls eine Rolle innerhalb der HR in *Arabidopsis thaliana*. Es konnte gezeigt werden, dass RECQ4A spontane somatische Rekombinationsereignisse unterdrückt (Hartung *et al.*, 2007) und dabei in einem parallelen Signalweg zu FANCM agiert (Knoll *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Doppelmutante *mhf1-1 recq4A-4* auf ihre spontane Rekombinationsrate hin in somatischen Zellen untersucht. Agieren MHF1 und RECQ4A in einem gemeinsamen Signalweg, würde eine Rekombinationsrate entweder auf Niveau der *mhf1-1* oder der *recq4A-4* Einzelmutante zu erwarten sein, wobei dann MHF1 oder RECQ4A jeweils vor dem anderen Protein aktiv wären. Sind beide Proteine in unterschiedlichen HR-Wegen aktiv, so wäre ein intermediärer Phänotyp zu erwarten. Bei Betrachtung der Rekombinationsraten der beiden Einzelmutanten konnte festgestellt werden, dass die Reduktion der HR-Rate in *mhf1-1* um etwa die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp sehr gering im Vergleich zur starken Erhöhung der Rate in *recq4A-4* war (Abbildung 3.11). Die Rekombinationsrate der *recq4A-4* Einzelmutante war im Vergleich zum Wildtyp etwa fünffach erhöht. Dies könnte zur Folge haben, dass in der Doppelmutante eine geringe Reduktion der Rekombinationsrate durch den Ausfall von *MHF1* im Vergleich zur hohen Rate in *recq4A-4* nicht detektierbar wäre. Tatsächlich war die spontane Rekombinationsrate der Doppelmutante vergleichbar mit der der *recq4A-4* Einzelmutante (Abbildung 3.11), womit die Möglichkeit dass MHF1 vor RECQ4A im gleichen Signalweg aktiv wäre ausgeschlossen werden kann. Allerdings kann zwischen den anderen beiden Möglichkeiten nicht unterschieden werden. Es könnte entweder sein, dass MHF1 und RECQ4A im gleichen Rekombinationsweg agieren und RECQ4A dabei vor MHF1 aktiv wäre. Andererseits könnten beide aber auch in parallelen Wegen agieren und die, im Verhältnis zur stark erhöhten Rekombinationsrate der *recq4A-4* Einzelmutante nur geringe Reduktion der Rate durch Mutation von *MHF1* maskiert werden. Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass AtFANCM und AtMHF1 in einem gemeinsamen Weg innerhalb der HR agieren und bereits bekannt war, dass AtFANCM und AtRECQ4A in parallelen HR-Wegen aktiv sind (Knoll *et al.*, 2012), ist anzunehmen, dass auch AtMHF1 und AtRECQ4A Funktionen unabhängig voneinander übernehmen.

Ähnlich wie die Situation während der Interstrang-CL Reparatur in *Arabidopsis thaliana*, scheint auch während der spontanen homologen Rekombination in somatischen Zellen MHF1 in einem gemeinsamen Weg mit FANCM und MUS81 und in einem parallelen Signalweg zu RECQ4A zu agieren. Ein Modell der aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Einordnung von MHF1 in die HR-Wege ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

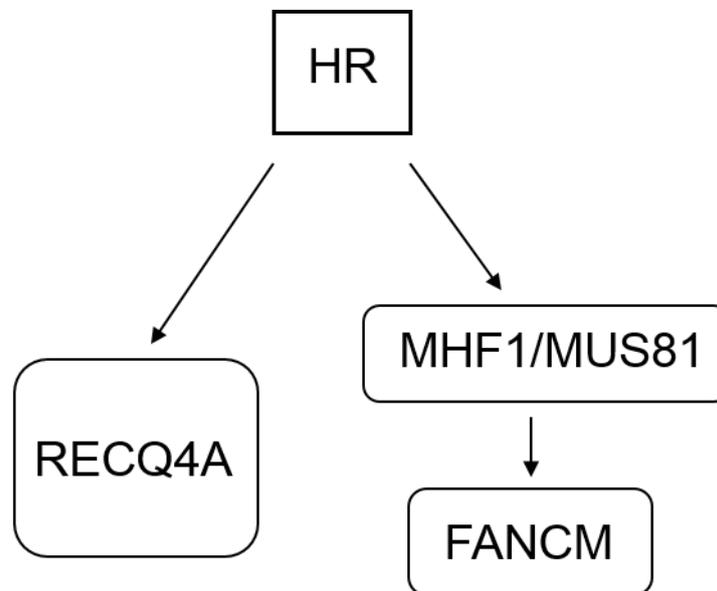


Abbildung 4.2: Modell über die in die somatische homologe Rekombination (HR) involvierten Reparaturwege mit Einordnung von MHF1 in *Arabidopsis thaliana*.

Die Abbildung zeigt ein hypothetisches Modell, das die verschiedenen Signalwege innerhalb der somatischen HR darstellt. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ergaben, dass MHF1 im gleichen Signalweg vor MUS81 und FANCM agiert und in einem parallelen Weg zu RECQ4A aktiv ist.

4.1.4 Die Funktion von AtMHF1 in der Meiose

Für die Homologe von MHF1 und FANCM in Säugern und in *S. cerevisiae* konnte bisher noch keine Funktion innerhalb der Meiose identifiziert werden. In der Spaltheife allerdings agieren SpMhf1 und SpFml1, das Homolog zu FANCM, gemeinsam während der Meiose, um die Entstehung von NCO Produkten zu fördern (Lorenz *et al.*, 2012; Bhattacharjee *et al.*, 2013). Nach Entstehung von DSBs in der Meiose kommt es zur Invasion des freien Einzelstrangs in den intakten homologen Doppelstrang, was zur Ausbildung eines sogenannten D-loops führt, der anhand des komplementären Strangs verlängert wird (vgl. Abschnitt 1.1). Für die Homologe von FANCM in Hefe wurde postuliert, dass diese, zusammen mit Mhf1 und Mhf2, D-loop Strukturen stabilisieren und dadurch NCO Produkte fördern (Sun *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 2009; Lorenz *et al.*, 2012; Bhattacharjee *et al.*, 2013). Auch für FANCM in *Arabidopsis* wurde bereits eine Funktion innerhalb der Meiose beschrieben, da die Mutation von *FANCM* zu verschiedenen Defekten in Meiozyten führt (Knoll *et al.*, 2012). Da, wie in Abschnitt 3.1.3, AtMHF1 in die somatische homologe Rekombination involviert ist, könnte es durchaus

sein, dass MHF1 auch in der Regulation der meiotischen homologen Rekombination aktiv ist. Um dies zu überprüfen, wurden Meiozytenpräparationen von *mhf1-1* und *mhf1-2* angefertigt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, zeigten beide *mhf1* Mutanten verschiedene Defekte während der Meiose auf. Die Synapsis, die die Paarung von homologen Chromosomen beschreibt, konnte während des Pachytäns normal stattfinden. Die Mutation von *MHF1* scheint in diesem Vorgang zu keinen Problemen zu führen. Für *fancm* Mutanten konnte allerdings nachgewiesen werden, dass diese einen Defekt in der Synapsis im Pachytän aufwiesen (Knoll *et al.*, 2012). MHF1 scheint in diesem Schritt der Meiose, im Gegensatz zu FANCM, keine Funktionen auszuüben. Allerdings konnten, wie auch für *fancm*, in *mhf1* Mutanten vermehrt intensiv gefärbte zirkuläre Strukturen ausgemacht werden. Diese zirkulären Strukturen führen wahrscheinlich im anschließenden Diplotänstadium der Meiose I, innerhalb dessen die homologen Chromosomen gepaart in Form von fünf Bivalenten vorliegen, in *mhf1-1* und *mhf1-2* zu chromosomalen Brücken. Bei diesen Brücken handelte es sich wahrscheinlich um Fusionen zwischen den Bivalenten, also den nicht-homologen Chromosomen. Solche Chromatinbrücken könnten aus der Tatsache resultieren, dass homologe Rekombination von Sequenzen auf nicht-homologen Chromosomen stattgefunden hat. Dennoch müssen hierfür die Sequenzen zumindest teilweise homologe Bereiche aufweisen, wodurch die meisten Gene nicht in Frage kommen, da sie sich nur auf einem Chromosom befinden. Mögliche homologe Bereiche, die auf mehreren Chromosomen vorkommen, stellen Sequenzwiederholungen innerhalb der Telomere oder der Centromere, aber auch rDNA Loci dar. Eine Möglichkeit zur Überprüfung, ob es sich bei diesen Fusionen um Brücken zwischen rDNA Loci auf nicht-homologen Chromosomen handelt, wäre die *Fluoreszenz in situ Hybridisierung* (FISH). In Arabidopsis sind die Loci der 5S und 45S rDNA spezifisch verteilt, so dass die fünf Chromosomen anhand der Lage der 5S und 45S rDNA voneinander unterschieden werden können (Fransz *et al.*, 1998; Sanchez Moran *et al.*, 2001). Würde man nun Sonden zur Erkennung der 5S und der 45S rDNA verwenden, könnte untersucht werden, ob diese Brücken zwischen den rDNA Loci von nicht-homologen Chromosomen ausgebildet werden. Weiterhin könnten auf diese Weise auch Centromer- und Telomersonden verwendet werden. Diese Brücken waren auch noch in späteren Stadien wie der Anaphase I detektierbar. Zum Ende der Meiose II in der Telophase II konnten ebenfalls Defekte in beiden *mhf1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ausgemacht werden. Hierbei kam es entweder zu ungleichen Verteilungen der Chromatiden, wobei eine Keimzelle sechs und eine andere vier Chromatiden aufwies oder zu Chromatiden, die sich abseits der anderen Chromatiden befanden und nicht exakt auf die Mikrosporenmutterzellen zugeteilt wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die beobachteten Chromatinbrücken sein, die während des Diplotäns und der Anaphase innerhalb der Meiose I auftraten. Werden die Chromosomen (Meiose I) beziehungsweise die Chromatiden (Meiose II) während der späten Anaphase voneinander getrennt, könnte es durch diese Fusionen zur ungleichen Verteilung oder zu Brüchen innerhalb des Chromatins kommen.

Die im Rahmen dieser Arbeit detektierten Defekte in *mhf1* Mutanten ähneln sehr stark den Defekten, die bereits in *fancm* Mutanten in *Arabidopsis* beschrieben wurden (Knoll *et al.*, 2012). Da bereits für Hefe gezeigt werden konnte, dass die Homologe von MHF1 und FANCM innerhalb der Meiose wahrscheinlich zusammen agieren, ist anzunehmen, dass auch AtMHF1 und AtFANCM während der meiotischen Rekombination in *Arabidopsis* gemeinsame Funktionen übernehmen (Dangel *et al.*, 2014). Diese Vermutung wurde dadurch bestätigt, dass gezeigt werden konnte, dass AtMHF1 und AtFANCM zusammen die Entstehung von CO-Ereignissen innerhalb der Meiose unterdrücken (Girard *et al.*, 2014).

4.2 Identifikation von FAN1 in *Arabidopsis thaliana*

Zur Beseitigung von DNA Interstrang-CLs werden neben den FANC-Proteinen auch mehrere Fanconi-assoziierte Proteine benötigt. Eines dieser Fanconi-assoziierten Proteine stellt die Nuklease FAN1 dar. Nach Aktivierung des FA-Signalwegs durch FANCM, wird im Laufe des Reparaturwegs das Heterodimer FANCD2/FANCI monoubiquitiniert. Aufgrund der Tatsache, dass FAN1 mit monoubiquitiniertem FANCD2 interagiert, kann die Nuklease an den DNA-Schaden rekrutiert werden und ist möglicherweise an der Exzision des CL beteiligt. In *S. pombe* liegt FAN1 konserviert vor und es konnte gezeigt werden, dass SpFan1 auch an der Reparatur von Interstrang-CLs beteiligt ist (Fontebasso *et al.*, 2013). Auch in *Arabidopsis thaliana* konnte mittels BLAST-Analysen ein Homolog zu HsFAN1 identifiziert werden, dessen Funktion im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert wurde.

4.2.1 Bioinformatische Untersuchungen von AtFAN1

Um die Verwandtschaftsbeziehungen von FAN1 Homologen in Tieren, Pilzen und Pflanzen besser zu verstehen, wurde ein phylogenetischer Baum mit den Proteinsequenzen von FAN1 in verschiedenen Organismen berechnet. Der berechnete phylogenetische Baum deutete darauf hin, dass die Homologe von FAN1 in Pflanzen und in Tieren ähnlicher zueinander sind als die Homologe von Tieren und Pilzen (Abbildung 3.16). Sowohl in Tieren, Pflanzen als auch in Pilzen besitzt das FAN1 Protein die VRR-Nukleasedomäne. Die UBZ-Domäne scheint in Pilzen nicht konserviert vorzuliegen. Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, ist bisher unklar, ob in pflanzlichen FAN1 Homologen eine UBZ-Domäne zu finden ist. Es scheinen zwar einige Aminosäuren im Bereich der UBZ-Domäne in HsFAN1 und AtFAN1 konserviert vorzuliegen, ob allerdings eine funktionelle UBZ-Domäne wirklich vorhanden ist, bleibt unklar. Da durch ein Alignment der HsFAN1 und AtFAN1 konservierte Aminosäuren im Bereich der UBZ-Domäne festgestellt werden konnten, die in SpFan1 fehlen, könnte dies die höhere Verwandtschaft von pflanzlichen zu tierischen FAN1 Homologen im Vergleich zu den Pilzen erklären. Im Rahmen der Komplementationsanalysen in dieser Arbeit (vgl. Abschnitt 3.2.4) wurde getestet, ob

die Funktionalität von AtFAN1 trotz Deletion der möglichen UBZ-Domäne gewährleistet war, was auf ein mögliches Vorhandensein oder Fehlen dieser Domäne schließen lassen könnte und in Abschnitt 4.2.4 diskutiert wird.

4.2.2 Charakterisierung einer Insertionsmutante von AtFAN1

Zur Charakterisierung von FAN1 in Arabidopsis wurde die T-DNA Insertionsmutante *fan1-1* (GABI_815C08; Rosso *et al.*, 2003) verwendet. Die T-DNA Integration konnte in Intron 14 festgestellt werden (Abbildung 3.17). Auf Sequenzebene konnte allerdings nur das 5' Ende der Insertion exakt bestimmt werden. 3' der T-DNA war keine genaue Bestimmung der Sequenz möglich. Durch PCR Analysen konnte aber gezeigt werden, dass die Gensequenz ab Position 3923 bp wieder vollständig ist und es durch die T-DNA Insertion wahrscheinlich zu keinen größeren genomischen Veränderungen kam. Dadurch, dass das 3' Ende der Insertion nicht genau bestimmt werden konnte, könnte es sein, dass während der Integration der T-DNA es an dieser Stelle zu Deletionen im Bereich der T-DNA Sequenz kam, was schließlich ein Bestimmen des exakten 3' Endes schwierig machte. Aufgrund der Tatsache, dass die T-DNA Insertion in *fan1-1* in einem Intron liegt, könnte es durchaus sein, dass diese während des Spleißens wieder entfernt wird und das Resultat ein voll funktionsfähiges Protein wäre. Um dies zu überprüfen, wurden Expressionsanalysen des *FAN1* Gens in der *fan1-1* Mutante durchgeführt. Hierfür wurden drei verschiedene Primerkombinationen verwendet, die ein Produkt 5' der Insertion, über die T-DNA oder 3' der Insertion erzeugen konnten. Wäre die Expression von *FAN1* durch das Vorhandensein der T-DNA gestört, so sollte keine Expression zu messen sein. 5' der T-DNA war eine Expression von *FAN1* in der Mutante zu messen, die vergleichbar mit der im Wildtyp war. Allerdings war über die T-DNA keine und 3' der Insertion nur eine sehr geringe Expression auszumachen (Abbildung 3.18), was darauf schließen lässt, dass die T-DNA durch Spleißvorgänge nicht entfernt wurde und die Genexpression unterbrochen wird. Da 5' der Insertion eine zum Wildtyp vergleichbare Expression zu messen war, könnte dies zur Bildung eines verkürzten Teilproteins führen, was Funktionen innerhalb der Zelle ausüben könnte. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Phänotypen in der *fan1-1* Mutante wirklich auf das Fehlen von *FAN1* zurückzuführen sind, könnte eine zweite *fan1* Mutante untersucht werden. Würden die gleichen Defekte wie in *fan1-1* auftreten, könnte davon ausgegangen werden, dass diese wirklich auf die Mutation des *FAN1* Gens zurückzuführen sind. Da allerdings in Arabidopsis keine zweite T-DNA Mutante von *FAN1* vorlag, wurden Komplementationsanalysen durchgeführt. Hierbei wurde in die *fan1-1* Mutante die Sequenz des Wildtyp *FAN1* Gens eingebracht und untersucht, ob sich dadurch die Defekte aufheben lassen, worauf in Abschnitt 4.2.4 näher eingegangen werden soll.

4.2.3 Die Funktion von AtFAN1 in der DNA Reparatur

Es konnte bereits gezeigt werden, dass FAN1 im Menschen an der Reparatur von Interstrang-CLs beteiligt ist und dass es durch monoubiquitiniertes FANCD2 an den Schaden rekrutiert werden kann (Kratz *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; MacKay *et al.*, 2010; Smogorzewska *et al.*, 2010). Auch in *S. pombe* liegt FAN1 konserviert vor und scheint ebenfalls in die Reparatur von Interstrang-CLs involviert zu sein (Fontebasso *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob AtFAN1 in die Reparatur von verschiedenen DNA-Schäden involviert ist. Hierfür wurde die *fan1-1* Mutante auf eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedenen Genotoxinen überprüft. Für die Genotoxine Bleomycin, *cis*-Platin, MMS, HU und CPT konnte keine erhöhte Sensitivität beobachtet werden, weshalb anzunehmen ist, dass AtFAN1 nicht in die Reparatur von Schäden involviert ist, die durch diese Genotoxine induziert werden. Die Untersuchungen mit MMC, welches hauptsächlich Interstrang-CLs induziert, ergaben, dass *fan1-1* eine Hypersensitivität gegenüber solchen DNA-Schäden aufwies (Abbildung 3.19). Wie auch im Menschen und in der Spalthefe scheint FAN1 in *Arabidopsis thaliana* ebenfalls in die Reparatur von Interstrang-CLs involviert zu sein, was anhand der erhöhten Sensitivität gegenüber MMC sichtbar war. Interessanterweise ist *FAN1* dabei das erste der bereits untersuchten *FANCD*-Gene oder Fanconi-assoziierten Gene in *Arabidopsis*, welches direkt in die Interstrang-CL Reparatur involviert zu sein scheint und die Reparaturdefekte bereits in der Einzelmutante sichtbar waren.

4.2.4 Komplementationsanalysen von AtFAN1 mit verschiedenen FAN1 Konstrukten

Im Rahmen dieser Arbeit stand für die Charakterisierung von AtFAN1 nur eine T-DNA Insertionsmutante zur Verfügung. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Defekte in *fan1-1* wirklich auf die Mutation des *FAN1* Gens zurückzuführen sind, wurden Komplementationsanalysen durchgeführt. Hierfür wurde die Sequenz des *FAN1* Wildtyp Gens mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in die *fan1-1* Mutante eingebracht und untersucht, ob sich die Hypersensitivität von *fan1-1* gegenüber MMC mit Hilfe des Konstrukts aufheben lässt. In allen vier getesteten Komplementationslinien ließ sich die erhöhte Sensitivität der *fan1-1* Mutante vollständig aufheben (Abbildung 3.21). Demnach ist die Hypersensitivität von *fan1-1* wirklich auf das Fehlen des *FAN1* Gens zurückzuführen und nicht auf inserierte T-DNA Bereiche außerhalb des *FAN1* Gens. Diese Komplementierung bestätigt die Funktion von AtFAN1 innerhalb der Interstrang-CL Reparatur.

Mittels Komplementationsanalysen kann weiterhin untersucht werden, welche Domänen eines Proteins für bestimmte Funktionen des Proteins zuständig sind. Das FAN1 Protein ist modular aufgebaut und setzt sich aus verschiedenen Domänen zusammen. Im Menschen sind für die Funktion von FAN1

innerhalb der Interstrang-CL Reparatur zwei Domänen besonders wichtig, die Nukleasedomäne, die in FAN1 sowohl Exo- als auch Endonukleaseaktivität vermittelt und die UBZ-Domäne, über die FAN1 an den Schaden rekrutiert wird. Die Nukleasedomäne liegt auch in anderen Säugern und auch in *S. pombe* konserviert vor, was vermuten lässt, dass diese Domäne für die Funktion von FAN1 essentiell ist. Auch *Arabidopsis thaliana* FAN1 enthält diese Nukleasedomäne, allerdings ist bisher unklar, ob diese Domäne für die Funktion von AtFAN1 innerhalb der Interstrang-CL Reparatur benötigt wird. Um dies zu überprüfen wurden zwei verschiedene Konstrukte kloniert, die jeweils eine andere Punktmutation innerhalb der Nukleasedomäne aufwiesen und die Nukleasefunktion damit inhibieren sollen. Diese Punktmutationen wurden zuvor bereits bei der Domänenanalyse von FAN1 im Menschen getestet (Kratz *et al.*, 2010). Beide Mutationen sollen die Endonukleaseaktivität von FAN1 an 5' Überhängen und verzweigten DNA-Strukturen verhindern. Das erste Konstrukt, auch FAN1 NUC1 genannt, enthielt eine Punktmutation an Position 833, die zu einem Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Alanin führte. Das zweite Konstrukt, FAN1 NUC2, trug eine Punktmutation an Position 854, was zum Austausch der Aminosäure Lysin zu Alanin führte. Beide Konstrukte wurden jeweils mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in die *fan1-1* Mutante eingebracht und pro Konstrukt vier genetisch unterschiedliche Linien auf ihre Sensitivität gegenüber MMC hin untersucht. Die Analyse der Komplementationslinien, die das FAN1 NUC1 Konstrukt trugen, ergab, dass die Hypersensitivität von *fan1-1* durch Einbringen dieses Konstrukts nicht aufgehoben werden konnte (Abbildung 3.23 A). Alle vier getesteten Linien zeigten ein zur *fan1-1* Mutante vergleichbares relatives Frischgewicht auf und konnten damit die erhöhte Sensitivität gegenüber MMC nicht komplementieren. Dies könnte entweder darauf zurückzuführen sein, dass die Nukleasedomäne von FAN1 essentiell für die Funktion innerhalb der Reparatur von Interstrang-CLs ist oder dass das Konstrukt in allen vier Komplementationslinien nicht exprimiert wird. Die T-DNA mit enthaltenem Konstrukt befindet sich in den vier Linien jeweils an einer anderen Stelle im Genom der *fan1-1* Mutante, allerdings ist die genaue Position unbekannt. Es könnte daher sein, dass das Konstrukt jeweils an einer Stelle positioniert ist, die transkriptionsinaktiv ist oder nur selten abgelesen wird. Dadurch würde kein modifiziertes FAN1 Protein synthetisiert werden und könnte demnach auch nicht an der Reparatur des Interstrang-CLs beteiligt sein. Um zu überprüfen, ob das Konstrukt in allen vier Linien abgelesen wird, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Hierfür wurde ein Primerpaar gewählt, welches ein Produkt innerhalb des *FAN1* Gens liefern kann. Allerdings wurden die Primer so positioniert, dass diese die T-DNA Insertion innerhalb des *FAN1* Gens flankieren und somit nur ein Produkt innerhalb des eingebrachten Konstrukts liefern konnten. Zum Vergleich wurde die Expression der *fan1-1* Mutante und des Wildtyp getestet. Die Expressionsanalyse ergab, dass in allen vier Linien das Konstrukt FAN1 NUC1 exprimiert wird (Anhang Abbildung 8.12). Diese Analyse basiert allerdings nur auf Überprüfung auf mRNA Ebene. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gebildete mRNA wieder abgebaut wird und es zu keiner Synthese des FAN1 Proteins kommt. Allerdings wurde ja bereits das FAN1 WT Konstrukt getestet, welches in der Lage war, die Sensitivität von *fan1-1* vollständig aufzuheben. Da in diesem Zusammenhang das System zu

funktionieren scheint und ein FAN1 Protein gebildet werden kann, ist davon auszugehen, dass auch das FAN1 NUC1 Konstrukt zur Bildung eines funktionellen Proteins mit inaktiver Nukleasedomäne führt. Für diese Annahme spricht ebenfalls die Tatsache, dass diese Punktmutation innerhalb von *FAN1* im Menschen bereits getestet wurde und zur Bildung eines Proteins führte (Kratz *et al.*, 2010). Da im Rahmen dieser Arbeit die Hypersensitivität von *fan1-1* gegenüber MMC durch das FAN1 NUC1 Konstrukt nicht komplementiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass in Arabidopsis die Nukleasedomäne essentiell für Funktion von FAN1 in der Beseitigung von Interstrang-CLs ist. Dies konnte bereits für die Funktion von FAN1 im Menschen gezeigt werden, da auch hier dieselbe Punktmutation nicht zur Komplementation der erhöhten Sensitivität der Mutante gegenüber Interstrang-CLs führen konnte (Kratz *et al.*, 2010).

Das zweite Konstrukt mit Punktmutation innerhalb der Nukleasedomäne, FAN1 NUC2, führte in den vier getesteten Linien zu einem im Vergleich zur *fan1-1* Mutante und zum Wildtyp intermediärem Phänotyp. Die Hypersensitivität von *fan1-1* konnte nur partiell komplementiert werden (Abbildung 3.23 B). Dies könnte entweder dadurch erklärt werden, dass trotz Punktmutation eine Rest-Nukleaseaktivität existiert, die teilweise die Reparaturfunktion in *fan1-1* übernehmen könnte oder dass in allen vier Linien das Konstrukt nur vermindert exprimiert wird. Aus diesem Grund wurden auch Expressionanalysen von *FAN1* in diesen Linien durchgeführt, die ergaben, dass in den untersuchten FAN1 NUC2 Linien das *FAN1* Gen mindestens gleich stark wie im Wildtyp exprimiert wird (Anhang Abbildung 8.13). Die Untersuchung des Konstrukts im Menschen ergab, dass das entstandene FAN1 Protein trotz Punktmutation eine Rest-Nukleaseaktivität aufweist, die teilweise zur Reparatur der Interstrang-CLs führen und dadurch die erhöhte Sensitivität partiell aufheben konnte (Kratz *et al.*, 2010). Aufgrund der Tatsache, dass das Konstrukt FAN1 NUC2, im Vergleich zu FAN1 NUC1, die erhöhte Sensitivität nur teilweise komplementieren konnte, ist davon auszugehen, dass auch in Arabidopsis das Konstrukt FAN1 NUC2 zu einer geringen Restaktivität der Nuklease führt.

Auch die UBZ-Domäne von FAN1 im Menschen scheint essentiell für die Funktion innerhalb der Interstrang-CL Reparatur zu sein, da FAN1 über diese an monoubiquitiniertes FANCD2 des FA-Signalwegs binden kann. In SpFan1 fehlt diese Domäne, allerdings liegt hier auch FANCD2 nicht konserviert vor, was das Fehlen dieser Domäne erklären könnte. Die Analyse der UBZ-Domäne von FAN1 im Menschen ergab, dass bei Fehlen oder Mutation dieser Domäne keine Lokalisation von FAN1 an den DNA Schaden durch Interaktion mit FANCD2 erfolgt (Kratz *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; MacKay *et al.*, 2010; Smogorzewska *et al.*, 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Deletionsmutanten mit fehlender UBZ-Domäne die erhöhte Sensitivität von Hs*fan1* Mutanten nicht komplementieren konnten (Liu *et al.*, 2010). Wie bereits in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, konnte mittels Domänensuchprogrammen keine UBZ-Domäne für Arabidopsis FAN1 identifiziert werden. Allerdings konnten durch ein Alignment der menschlichen FAN1 Sequenz und der Sequenz von Arabidopsis im Bereich der menschlichen UBZ-Domäne einige konservierte Aminosäuren in AtFAN1 detektiert

werden. Um zu untersuchen, ob eine UBZ-Domäne in AtFAN1 existiert und ob diese essentiell für die Funktion von FAN1 innerhalb der Interstrang-CL Reparatur ist, wurde ein Konstrukt kloniert, welches eine komplette Deletion der möglichen UBZ-Domäne aufwies, das als FAN1 Del UBZ benannt wurde. Wie die anderen Konstrukte wurde auch dieses in die *fan1-1* Mutante mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation eingebracht und anschließend vier genetisch unterschiedliche Linien auf ihre Sensitivität gegenüber MMC hin untersucht. Die Analyse ergab, dass die erhöhte Sensitivität der *fan1-1* Mutante gegenüber MMC in den vier getesteten Linien nicht aufgehoben werden konnte (Abbildung 3.25). Wie in den anderen Konstrukten wurde auch hier die Expression von *FAN1* getestet und es stellte sich heraus, dass in den vier FAN1 Del UBZ Linien *FAN1* exprimiert wird (Anhang Abbildung 8.14). Dadurch, dass durch das Fehlen der UBZ-Domäne die starke Sensitivität der *fan1* Mutante nicht aufgehoben werden kann, kann schlussgefolgert werden, dass auch in Arabidopsis FAN1 eine UBZ-Domäne vorhanden und diese für die Funktion von FAN1 innerhalb der Interstrang-CL Reparatur essentiell ist. Auch hier könnte demnach spekuliert werden, dass FAN1 in Arabidopsis mittels der UBZ-Domäne an monoubiquitiniertes FANCD2 binden und dadurch an den DNA-Schaden rekrutiert werden könnte.

4.2.5 Die Funktion von AtFAN1 bei Replikationsstress im Wurzelmeristem

In *Arabidopsis thaliana* scheint die Nuklease FAN1, wie auch in Säugern bereits gezeigt wurde, ebenfalls an der Reparatur von Interstrang-CLs beteiligt zu sein. Dies wurde durch Überprüfen der Sensitivität der *fan1* Mutante gegenüber dem Interstrang-CL induzierenden Agens MMC analysiert. Durch Untersuchung des Wurzelmeristems kann die Beteiligung von Proteinen an der Beseitigung von Replikationsstress überprüft werden. Das Wurzelmeristem setzt sich aus sich teilenden und noch undifferenzierten Zellen zusammen. Entsteht ein DNA-Schaden innerhalb der Zelle führt dies oft zu Replikationsstress, da die Replikationsmaschinerie nicht über den Schaden hinweg synthetisieren kann. Auf diesen Replikationsstress folgt meist eine kurzzeitige Hemmung der Zellteilung, bis der Schaden beseitigt werden konnte. Kommt es aber zur Anhäufung von Schäden, die nicht mehr repariert werden können, wird der Tod der Zelle induziert. Da das Wurzelmeristem viele sich teilende Zellen enthält, ist dieses besonders gut zur Untersuchung von DNA Schäden geeignet. Neben der Untersuchung von spontanem Replikationsstress, eignet sich das Wurzelmeristem aber auch zur Untersuchung von induziertem Replikationsstress, wie etwa durch das Genotoxin MMC. Um die Beteiligung von AtFAN1 innerhalb Reparatur von spontanem, aber auch durch MMC-induzierten Replikationsstress zu untersuchen, wurde das Wurzelmeristem von *fan1-1* im Vergleich zum Wildtyp im Grundzustand und nach MMC-Behandlung untersucht. Hierfür wurden die Pflanzen vier Tage angezogen und dann für 18 h in MMC inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen mit Propidiumiodid behandelt, das in der Lage ist, abgestorbene Zellen und auch den Interzellullarraum anzufärben (Curtis und Hays, 2007).

Anschließend wurden die Wurzeln am Konfokalmikroskop ausgewertet. Ist die Reparatur von DNA Schäden durch Fehlen eines Gens gestört, würden mehr abgestorbene Zellen innerhalb der Wurzel im Vergleich zum Wildtyp zu erwarten sein. Die Anzahl abgestorbener Zellen in *fan1-1* und dem Wildtyp wurden im Grundzustand, ohne Genotoxinzugabe, und nach Zugabe von 2,5 µg/ml MMC bestimmt. Zur Auswertung wurde die Anzahl an Wurzeln bestimmt, die mindestens eine tote vaskuläre, Endodermis, Epidermis oder Columella SZ, TA-Zelle oder eine tote Zelle im ruhenden Zentrum aufwiesen. Im Grundzustand waren sowohl in *fan1-1* als auch im Wildtyp eine vergleichbare Anzahl Wurzeln mit toten TA-Zellen auszumachen (Abbildung 3.26). FAN1 ist demnach nicht an der Reparatur von spontanem Replikationsstress beteiligt. Nach Behandlung mit MMC war die Anzahl von Wurzeln mit toten TA-Zellen in *fan1-1* doppelt so hoch als im Wildtyp. Auffallend war, dass in *fan1-1* auch abgestorbene Zellen im Bereich der Endodermis und Epidermis SZ, aber auch im ruhenden Zentrum auszumachen waren, die im Wildtyp nicht auftraten. Weiterhin wurden sowohl in *fan1-1* als auch im Wildtyp eine vergleichbare Anzahl an Wurzeln mit abgestorbenen vaskulären SZ beobachtet (Abbildung 3.27). Die erhöhte Anzahl an Wurzeln mit toten Stammzellen nach MMC-Behandlung in *fan1-1* bestätigt die Funktion von AtFAN1 in der Reparatur von Replikationsschäden, induziert durch Interstrang-CLs. Fällt *FAN1* durch Mutation aus, können die durch MMC induzierten Schäden nicht mehr vollständig repariert werden, woraufhin es zur Akkumulierung dergleichen kommt. Diese Anhäufung führt schließlich zum Absterben der Zellen, was anhand einer vermehrten Anzahl Propidiumiodid-gefärbter Zellen auszumachen war. Eine Rolle von FAN1 innerhalb der Interstrang-CL Reparatur in *Arabidopsis thaliana* konnte im Rahmen dieser Arbeit schließlich durch zwei verschiedene Methoden nachgewiesen werden.

4.2.6 Die Funktion von AtFAN1 in der somatischen homologen Rekombination

Für HsFAN1 wird nicht nur eine Funktion während des *unhooking* Prozesses postuliert, es wird auch diskutiert, dass FAN1 in die HR involviert ist. Dabei könnte FAN1 als Exonuklease unter anderem an der Resektion der freien Bruchenden zur Generierung von 3' Enden beteiligt sein oder auch an der vollständigen Beseitigung des ausgeschnittenen CL involviert sein (Smogorzewska *et al.*, 2010). Mehrere Arbeitsgruppen konnten allerdings die Vermutung, dass FAN1 an der Resektion der Bruchenden involviert ist, widerlegen (Kratz *et al.*, 2010; MacKay *et al.*, 2010). Dennoch wird angenommen, dass FAN1 möglicherweise an einem späteren Schritt innerhalb der HR beteiligt ist. Um zu überprüfen, ob FAN1 in *Arabidopsis* in die somatische HR involviert ist, wurde die Mutante mit der IC9 Reporterlinie gekreuzt und auf ihre somatische HR Rate hin untersucht. Die Nuklease FAN1 scheint in *Arabidopsis* keine direkte Funktion innerhalb der somatischen homologen Rekombination zu übernehmen, da die Rekombinationsrate von *fan1-1* vergleichbar mit der des Wildtyps war

(Abbildung 3.28). Im Gegensatz dazu, konnte für MHF1 und auch für FANCM in Arabidopsis eine Funktion innerhalb der HR nachgewiesen werden (diese Arbeit und Knoll *et al.*, 2012). Es könnte dennoch sein, dass AtFAN1 nicht an spontanen Rekombinationsereignissen beteiligt ist, dafür aber eine Funktion innerhalb der HR während der Interstrang-Cl Reparatur übernimmt. Um dies zu überprüfen, müsste die Rekombinationsrate von *fan1-1* im Vergleich zum Wildtyp nach MMC-Behandlung untersucht werden.

4.2.7 Einordnung von FAN1 in die Interstrang-CL Reparatur

In Arabidopsis wurden bereits mehrere Proteine identifiziert, die in die Reparatur von Interstrang-CLs involviert sind. Es handelt sich dabei um die ATPase RAD5A und um die Nuklease MUS81, die innerhalb dieser Reparatur in Arabidopsis unabhängig voneinander agieren (Mannuss *et al.*, 2010). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse identifizierten noch einen weiteren wichtigen Faktor der Interstrang-CL Reparatur in *A. thaliana*, die RecQ-Helikase RECQ4A (Abschnitt 3.1.2 und 4.1.2). Um FAN1 in die bereits bekannten Interstrang-CL Reparaturwege einzuordnen, wurden Doppelmutante mit *fan1-1* und den Mutanten der Gene *RECQ4A*, *MUS81* und *RAD5A* hergestellt und auf ihre Sensitivität gegenüber MMC untersucht.

Die Untersuchung der *fan1-1 recq4A-4* Doppelmutante ergab, dass diese ein zu *fan1-1* vergleichbares relatives Frischgewicht nach MMC-Behandlung aufwies (Abbildung 3.29). Wie zu erwarten, zeigte die *recq4A-4* Einzelmutante keine Hypersensitivität gegenüber MMC. Da jedoch durch Analyse der *mhf1-1 recq4A-4* Doppelmutante gezeigt werden konnte, dass RECQ4A ebenfalls in die Reparatur von Interstrang-CLs involviert ist (Abschnitt 3.1.2), ist davon auszugehen, dass AtFAN1 und AtRECQ4A im gleichen Signalweg agieren. Interessanterweise steht dieses Ergebnis im Gegensatz zu den gewonnenen Erkenntnissen über AtMHF1, welches, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, in einem parallelen Reparaturweg zur Helikase AtRECQ4A agiert. Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass während der Reparatur von Interstrang-CLs FANCD2 mit der BLM-Helikase, dem funktionellen Homolog von RECQ4A im Menschen, interagiert (Pichierri *et al.*, 2004; Hirano *et al.*, 2005). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass auch FAN1 mit FANCD2 im FANCD2/BLM-Komplex agiert und dieser im Allgemeinen die Wiederaufnahme von blockierten Replikationsgabeln fördert (Chaudhury *et al.*, 2014). Diese Funktion trifft nicht nur auf blockierte Replikationsgabeln zu, die durch Interstrang-CLs induziert werden, sondern auch auf anderen Replikationsstress, der zum Stehenbleiben der Replikationsmaschinerie führt. Weiterhin scheint diese Funktion unabhängig vom FA-Signalweg ausgeübt zu werden (Chaudhury *et al.*, 2014). Die Analyse der Doppelmutante *fan1-1 recq4A-4* in Arabidopsis ergab, dass FAN1 und RECQ4A möglicherweise im gleichen Signalweg nach Induktion von Interstrang-CLs agieren. Ähnlich wie im Menschen könnten

auch AtFAN1 und AtRECQ4A, zusammen mit AtFANCD2, als Komplex agieren, um die Wiederaufnahme von blockierten Replikationsgabeln einzuleiten.

Auch die Doppelmutante aus den Mutanten der beiden Nukleasen FAN1 und MUS81 wurde auf ihre Sensitivität gegenüber Interstrang-CLs hin untersucht. Die bereits beschriebene Hypersensitivität der *mus81-1* Einzelmutante gegenüber MMC (Hartung *et al.*, 2006) konnte reproduziert werden (Abbildung 3.30). Agieren beide Nukleasen in zwei unabhängigen Wegen innerhalb der Interstrang-CL Reparatur, so wäre eine im Vergleich zu beiden Einzelmutanten additive Sensitivität in der Doppelmutante zu erwarten gewesen. Wären beide im gleichen Signalweg aktiv, so wäre eine zu *fan1-1* oder *mus81-1* vergleichbare Hypersensitivität zu erwarten. *fan1-1 mus81-1* zeigte eine im Vergleich zu beiden Einzelmutanten additive Sensitivität, was darauf schließen lässt, dass beide Nukleasen in zwei parallelen Reparaturwegen zur Beseitigung von Interstrang-CLs agieren. Diese Annahme wurde bereits für FAN1 und MUS81 im Menschen postuliert, wobei FAN1 und MUS81 beide in den Prozess des *unhooking* involviert sein könnten (Kratz *et al.*, 2010; MacKay *et al.*, 2010; Smogorzewska *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass FAN1 und MUS81 eine entgegengesetzte Polarität in Bezug auf ihre präferierten Substrate aufweisen, unterstützt diese Vermutung. Auch in Arabidopsis könnten FAN1 und MUS81 beide benötigt werden, um das *unhooking* des Interstrang-CL durchzuführen.

Für die ATPase RAD5A in Arabidopsis wurde bereits eine Funktion innerhalb der Interstrang-CL Reparatur nachgewiesen (Chen *et al.*, 2008). Im Rahmen der Untersuchung der *fan1-1 rad5A-2* Doppelmutante konnte die starke Sensitivität der *rad5A-2* Einzelmutante reproduziert werden. Das relative Frischgewicht der *fan1-1 rad5A-2* Doppelmutante befand sich auf Niveau des Frischgewichts der *rad5A-2* Einzelmutante (Abbildung 3.31). Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass FAN1 und RAD5A in einem gemeinsamen Signalweg zur Reparatur von Interstrang-CLs in Arabidopsis agieren.

Neben der Untersuchung von FAN1 in Bezug auf die bereits bekannten, wichtigen CL Reparaturgenen in Arabidopsis, wurde auch die Doppelmutante aus *fan1-1* und *mhf1-1* auf ihre Sensitivität gegenüber MMC untersucht. Da FAN1 im Menschen durch den FA-Signalweg an den DNA-Schaden rekrutiert wird, wird angenommen, dass FAN1 zusammen mit dem FA-Signalweg arbeitet. MHF1 im Menschen ist als Interaktionspartner des FANC-Proteins FANCM ebenfalls ein Bestandteil des FA-Signalwegs. Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine Funktion von MHF1, wahrscheinlich in einem gemeinsamen Signalweg mit FANCM, in der Reparatur von Interstrang-CLs in *Arabidopsis thaliana* aufgedeckt werden (vgl. Abschnitt 3.1.2). Um zu überprüfen, ob AtFAN1 und AtMHF1 möglicherweise in einem gemeinsamen Reparaturweg agieren, wurde die Doppelmutante *fan1-1 mhf1-1* hergestellt und untersucht. Wie zu erwarten, zeigte die Einzelmutante *mhf1-1* keine erhöhte Sensitivität gegenüber MMC (Abbildung 3.32). In *fan1-1* hingegen war eine Hypersensitivität zu beobachten, die auch vergleichbar mit der der Doppelmutante *fan1-1 mhf1-1* war. Die Situation in Arabidopsis scheint demnach ähnlich wie im Menschen zu sein, da AtFAN1 und AtMHF1 wahrscheinlich ebenfalls in einem

gemeinsamen Reparaturweg zur Beseitigung von Interstrang-CLs dienen. Wie für AtMHF1 auch, wurde ebenfalls das Zusammenspiel von AtFAN1 mit AtFANCJB analysiert. Hierfür wurde die Doppelmutante aus *fan1-1* und *fancjb-1* generiert und anschließend auf ihre Sensitivität gegenüber MMC hin untersucht. Die Analyse der Doppelmutante ergab, dass das relative Frischgewicht vergleichbar mit dem der beiden Einzelmutanten war (Abbildung 3.33). Dies führt zu der Annahme, dass FAN1 und FANCJB in Arabidopsis in einem gemeinsamen Signalweg innerhalb der Interstrang-CL Reparatur agieren. Interessanterweise konnte für AtFANCJB ebenfalls gezeigt werden (Köhler, 2014), dass es in einem gleichen Signalweg wie die Helikase RECQ4A agiert und parallel zur Nuklease MUS81 aktiv ist, was im Rahmen dieser Arbeit auch für FAN1 festgestellt werden konnte.

Mit der Nuklease FAN1 konnte im Rahmen dieser Arbeit, neben MHF1, noch ein weiterer Faktor identifiziert werden, der in die Reparatur von Interstrang-CLs in Arabidopsis involviert ist. Dabei wurde festgestellt, dass FAN1 in einem gleichen Signalweg wie die Helikase RECQ4A agiert. Dies steht im Gegensatz zu den gewonnenen Erkenntnissen über AtMHF1, welches parallel zu AtRECQ4A aktiv ist. Allerdings wurde ja, wie weiter oben diskutiert, bereits im Menschen ein mögliches Zusammenspiel von FAN1 mit FANCD2 und der BLM-Helikase, unabhängig vom restlichen FA-Signalweg beschrieben. Dies könnte in Arabidopsis ebenfalls der Fall sein. Entgegen der Tatsache, dass AtMHF1 im gleichen Signalweg wie die Nuklease AtMUS81 agiert, konnte für AtFAN1 eine von AtMUS81-unabhängige Funktion innerhalb der Interstrang-CL Reparatur identifiziert werden. Neben der Funktion im RECQ4A-abhängigen Signalweg, scheint FAN1 aber auch Funktionen innerhalb des RAD5A-abhängigen Interstrang-CL Reparaturwegs zu übernehmen. Über das Zusammenspiel der Nuklease FAN1 und der ATPase RAD5A wurde bisher noch nichts in anderen Organismen beschrieben. Allerdings wurde, wie bereits in Abschnitt 4.1.2 diskutiert, ein Agieren von SpFml1, dem Homolog von FANCM, und SpMhf1 im gleichen Signalweg wie SpRad5 beschrieben (Dae et al., 2012). Weiterhin konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass auch SpFml1 und SpFan1 im gleichen Reparaturweg zur Beseitigung von Interstrang-CLs in der Spaltheife aktiv sind (Fontebasso et al., 2013). Dies legt die Vermutung nahe, dass Fml1, Mhf1 und Fan1 zusammen im gleichen Signalweg wie Rad5 innerhalb der Reparatur von Interstrang-CLs in *S. pombe* involviert sind. Da das Ergebnis der Analyse der *fan1-1 mhf1-1* Doppelmutante in Arabidopsis auf ein Agieren im gleichen Signalweg hindeutete, könnte es durchaus sein, dass ähnlich wie in *S. pombe* auch in *A. thaliana* MHF1 und FAN1 zusammen mit RAD5A in einem gemeinsamen Reparaturweg agieren. Auch die Untersuchung der Doppelmutante aus *fan1-1* und *fancjb-1* legt die Vermutung nahe, dass AtFAN1 und AtFANCJB in einem gemeinsamen Signalweg zur Beseitigung von Interstrang-CLs agieren. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ergaben, dass sowohl FAN1, als auch FANCJB, im gleichen Signalweg wie RAD5A agieren. Aufgrund dieser Tatsache könnte spekuliert werden, dass die Beobachtung, dass FAN1 und FANCJB ebenfalls im gleichen Weg aktiv sind, darauf zurückzuführen ist, dass FAN1, FANCJB und RAD5A innerhalb eines Signalwegs in Arabidopsis zur Reparatur von Interstrang-CLs agieren. Ein

hypothetisches Modell über die Signalwege zur Interstrang-CL Reparatur in Arabidopsis mit Einordnung von FAN1 ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

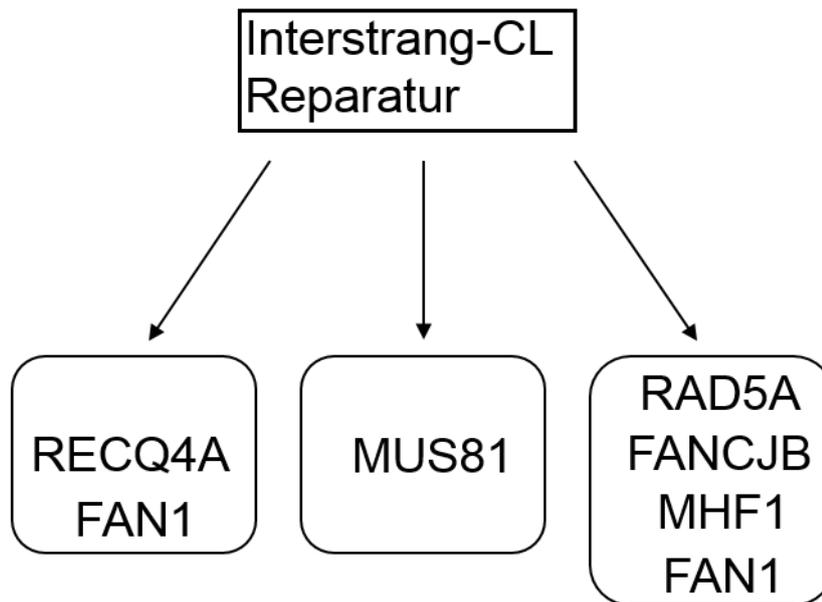


Abbildung 4.3: Modell über die Interstrang-Crosslink (CL) Reparaturwege mit Einordnung von FAN1 in *Arabidopsis thaliana*.

Die Abbildung zeigt ein hypothetisches Modell, das die verschiedenen Reparaturwege zur Beseitigung von Interstrang-CLs darstellt. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ergaben, dass FAN1 im gleichen Signalweg wie die Helikase RECQ4A agiert und ebenfalls in den gleichen Reparaturweg wie RAD5A, FANCJB und MHF1 involviert ist. Weiterhin agiert FAN1 parallel zu MUS81.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Funktionen die Proteine MHF1 und FAN1, die in Säugern Bestandteil der Interstrang-CL Reparatur durch den Fanconi Anämie-Signalweg sind, in Arabidopsis übernehmen.

Durch die Untersuchung zweier Insertionsmutanten für *MHF1* konnte gezeigt werden, dass beide Einzelmutanten keinen Defekt im Hinblick auf DNA-Schäden zeigten. Allerdings konnte durch die Generierung und Analyse verschiedener Doppelmutanten eine versteckte Funktion von MHF1 innerhalb der Reparatur von Interstrang-CLs entdeckt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese Funktion erst sichtbar wird, wenn sowohl MHF1 als auch die RecQ-Helikase RECQ4A in Arabidopsis fehlen. Auf diese Weise konnte nicht nur für MHF1, sondern auch für RECQ4A eine Funktion innerhalb der Interstrang-CL Reparatur identifiziert werden, die bisher noch nicht beschrieben wurde. Weiterhin konnte für MHF1 gezeigt werden, dass es im Hinblick auf die Reparatur von Interstrang-CLs in einem parallelen Weg zu RECQ4A agiert und in einem gemeinsamen Signalweg mit der Endonuklease MUS81 und der Helikase FANCM aktiv ist. Außerdem konnte demonstriert werden, dass MHF1 auch in den Reparaturweg der ATPase RAD5A und der Helikase FANCB involviert ist. Neben der Funktion von MHF1 in der Interstrang-CL Reparatur konnte mittels einer Rekombinations-Reporterlinie eine HR-fördernde Wirkung von MHF1 gezeigt werden. Interessanterweise agiert MHF1 innerhalb der somatischen Rekombination ebenfalls in einem gemeinsamen Signalweg mit MUS81 und FANCM und in einem parallelen Weg zur RecQ-Helikase RECQ4A. Weiterhin konnte für MHF1 in Arabidopsis gezeigt werden, dass es nicht nur in die somatische HR involviert ist, sondern auch eine Rolle in der meiotischen Rekombination spielt und dabei wahrscheinlich die Rekombination zwischen nicht-homologen Bereichen unterdrückt.

Für die Nuklease FAN1 in Arabidopsis konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine Funktion innerhalb der Reparatur von Interstrang-CLs nachgewiesen werden, die bereits in der Einzelmutante sichtbar war. Durch Analyse verschiedener Doppelmutanten konnte zudem gezeigt werden, dass FAN1 während dieser Reparatur in einem gemeinsamen Signalweg mit der RecQ-Helikase RECQ4A agiert und auch im gleichen Signalweg wie RAD5A, FANCB und auch MHF1 aktiv ist. Im Hinblick auf die somatische homologe Rekombination und auf die Reparatur spontaner Replikations-assoziiierter Schäden konnte für FAN1 im Rahmen dieser Arbeit keine direkte Funktion identifiziert werden. Allerdings ist FAN1 in die Reparatur von Replikationsschäden involviert, die durch Interstrang-CLs induziert werden, was durch Analyse von Stammzellen des Wurzelmeristems nachgewiesen werden konnte. Weiterhin konnte mittels Komplementationsanalysen gezeigt werden, dass sowohl die Nukleasedomäne, als auch die UBZ-Domäne essentiell für die Funktion von FAN1 während der Interstrang-CL Reparatur in Arabidopsis sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit erstmals die beiden Fanconi-assoziierten Proteine MHF1 und FAN1 in *Arabidopsis thaliana* grundlegend charakterisiert und ihre Funktionen innerhalb der DNA-Reparatur und der somatischen und meiotischen Rekombination definiert werden.

6 Summary

The aim of this thesis was to analyze the functions of the proteins MHF1 and FAN1 in *Arabidopsis thaliana* which are involved in the repair of interstrand crosslinks by the Fanconi Anaemia pathway in mammals.

The analysis of two insertion mutants of *MHF1* demonstrated that both single mutants did not show a defect during the repair of different types of DNA damage. However, through the generation and investigation of different double mutants, it was possible to uncover a hidden function of MHF1 during the repair of interstrand CLs. Interestingly, this function is only visible if both MHF1 and the RecQ-helicase RECQ4A are missing in Arabidopsis. Therefore, it was possible to define a function not only for MHF1, but also for RECQ4A during the repair of interstrand CLs in Arabidopsis which has not been shown before. Furthermore, it could be shown that MHF1 acts in a parallel pathway to RECQ4A and in a common pathway with the endonuclease MUS81 and the helicase FANCM for interstrand CL repair. Moreover, it was shown that MHF1 is involved in the repair pathway of the ATPase RAD5A and the helicase FANCJB. In addition to the function of MHF1 during the repair of interstrand CLs, it was possible to demonstrate that MHF1 promotes somatic homologous recombination. Thereby, MHF1 acts in the same pathway as MUS81 and FANCM and in a parallel pathway to RECQ4A, as well. Furthermore, it could be shown that MHF1 is not only involved in somatic homologous recombination but plays a role during meiotic recombination, as well, by suppressing recombination events between non-homologous regions in Arabidopsis.

For the nuclease FAN1 in Arabidopsis it was possible to identify a function during interstrand CL repair which was already visible in the single mutant. By the analysis of different double mutants it could be demonstrated that during this repair, FAN1 acts in the same pathway as the RecQ-helicase RECQ4A and that FAN1 is also involved in the same pathway as RAD5A, FANCJB and MHF1. In terms of somatic homologous recombination and the repair of replication-associated damage, no direct function for FAN1 could be found. However, the analysis of stem cells of the root meristem revealed that FAN1 is involved in the repair of replication damage that is induced by interstrand CLs. Furthermore, complementation studies in this thesis showed that both the nuclease domain and the UBZ domain of FAN1 are essential for the correct functioning of FAN1 during interstrand CL repair in Arabidopsis.

Therefore, it was possible to characterize the Fanconi-associated proteins MHF1 and FAN1 in *Arabidopsis thaliana* and to define their functions in DNA repair and somatic and meiotic homologous recombination for the first time in this thesis.

7 Literaturverzeichnis

- 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.
- Ali, A. M., Pradhan, A., Singh, T. R., Du, C., Li, J., Wahengbam, K., Grassman, E., Auerbach, A. D., Pang, Q. und Meetei, A. R. (2012). "FAAP20: a novel ubiquitin-binding FA nuclear core-complex protein required for functional integrity of the FA-BRCA DNA repair pathway." *Blood* **119**(14): 3285-94.
- 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.
- Amano, M., Suzuki, A., Hori, T., Backer, C., Okawa, K., Cheeseman, I. M. und Fukagawa, T. (2009). "The CENP-S complex is essential for the stable assembly of outer kinetochore structure." *J Cell Biol* **186**(2): 173-82.
- Arents, G. und Moudrianakis, E. N. (1993). "Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(22): 10489-93.
- Armstrong, S. J., Sanchez-Moran, E. und Franklin, F. C. (2009). "Cytological analysis of *Arabidopsis thaliana* meiotic chromosomes." *Methods Mol Biol* **558**: 131-45.
- Aylon, Y. und Kupiec, M. (2003). "The checkpoint protein Rad24 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in processing double-strand break ends and in recombination partner choice." *Mol Cell Biol* **23**(18): 6585-96.
- 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.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P. C., Nicolas, A. und Forterre, P. (1997). "An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination." *Nature* **386**(6623): 414-7.
- Bhagwat, N., Olsen, A. L., Wang, A. T., Hanada, K., Stuckert, P., Kanaar, R., D'Andrea, A., Niedernhofer, L. J. und McHugh, P. J. (2009). "XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of cross-link repair." *Mol Cell Biol* **29**(24): 6427-37.
- Bhattacharjee, S., Osman, F., Feeney, L., Lorenz, A., Bryer, C. und Whitby, M. C. (2013). "MHF1-2/CENP-S-X performs distinct roles in centromere metabolism and genetic recombination." *Open Biol* **3**(9): 130102.
- 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.
- Blastyak, A., Hajdu, I., Unk, I. und Haracska, L. (2010). "Role of double-stranded DNA translocase activity of human HLTF in replication of damaged DNA." *Mol Cell Biol* **30**(3): 684-93.
- Bleuyard, J. Y., Gallego, M. E. und White, C. I. (2004). "Meiotic defects in the *Arabidopsis rad50* mutant point to conservation of the MRX complex function in early stages of meiotic recombination." *Chromosoma* **113**(4): 197-203.
- 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.

- Block-Schmidt, A. (2010). "Charakterisierung von Interaktionspartnern des Brustkrebsgens BRCA1 in *Arabidopsis thaliana*." Botanisches Institut II, Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Boavida, L. C., Vieira, A. M., Becker, J. D. und Feijo, J. A. (2005). "Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote." Int J Dev Biol **49**(5-6): 615-32.
- Boddy, M. N., Lopez-Girona, A., Shanahan, P., Interthal, H., Heyer, W. D. und Russell, P. (2000). "Damage tolerance protein Mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase Cds1." Mol Cell Biol **20**(23): 8758-66.
- Boddy, M. N., Gaillard, P. H., McDonald, W. H., Shanahan, P., Yates, J. R., 3rd und Russell, P. (2001). "Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase." Cell **107**(4): 537-48.
- Bogliolo, M., Schuster, B., Stoepker, C., Derkunt, B., Su, Y., Raams, A., Trujillo, J. P., Minguillon, J., Ramirez, M. J., Pujol, R., Casado, J. A., Banos, R., Rio, P., Knies, K., Zuniga, S., Benitez, J., Bueren, J. A., Jaspers, N. G., Scharer, O. D., de Winter, J. P., Schindler, D. und Surralles, J. (2013). "Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia." Am J Hum Genet **92**(5): 800-6.
- Bonnet, S. (2009). "Neue Ansätze zur Beeinflussung der homologen Rekombination bei Pflanzen." Botanisches Institut II, Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Börner, G. V., Kleckner, N. und Hunter, N. (2004). "Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis." Cell **117**(1): 29-45.
- Bridge, W. L., Vandenberg, C. J., Franklin, R. J. und Hiom, K. (2005). "The BRIP1 helicase functions independently of BRCA1 in the Fanconi anemia pathway for DNA crosslink repair." Nat Genet **37**(9): 953-7.
- Cantor, S., Drapkin, R., Zhang, F., Lin, Y., Han, J., Pamidi, S. und Livingston, D. M. (2004). "The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2357-62.
- Cantor, S. B., Bell, D. W., Ganesan, S., Kass, E. M., Drapkin, R., Grossman, S., Wahrer, D. C., Sgroi, D. C., Lane, W. S., Haber, D. A. und Livingston, D. M. (2001). "BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function." Cell **105**(1): 149-60.
- Ceccaldi, R., Parmar, K., Mouly, E., Delord, M., Kim, J. M., Regairaz, M., Pla, M., Vasquez, N., Zhang, Q. S., Pondarre, C., Peffault de Latour, R., Gluckman, E., Cavazzana-Calvo, M., Leblanc, T., Larghero, J., Grompe, M., Socie, G., D'Andrea, A. D. und Soulier, J. (2012). "Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells." Cell Stem Cell **11**(1): 36-49.
- 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.
- Chaudhury, I., Stroik, D. R. und Sobek, A. (2014). "FANCD2-Controlled Chromatin Access of the Fanconi-Associated Nuclease FAN1 Is Crucial for the Recovery of Stalled Replication Forks." Mol Cell Biol **34**(21): 3939-54.
- Chen, I. P., Mannuss, A., Orel, N., Heitzeberg, F. und Puchta, H. (2008). "A homolog of ScRAD5 is involved in DNA repair and homologous recombination in *Arabidopsis*." Plant Physiol **146**(4): 1786-96.
- Chen, X. B., Melchionna, R., Denis, C. M., Gaillard, P. H., Blasina, A., Van de Weyer, I., Boddy, M. N., Russell, P., Vialard, J. und McGowan, C. H. (2001). "Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro." Mol Cell **8**(5): 1117-27.
- Ciccia, A., Ling, C., Coulthard, R., Yan, Z., Xue, Y., Meetei, A. R., Laghmani el, H., Joenje, H., McDonald, N., de Winter, J. P., Wang, W. und West, S. C. (2007). "Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM." Mol Cell **25**(3): 331-43.
- Ciccia, A., McDonald, N. und West, S. C. (2008). "Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins." Annu Rev Biochem **77**: 259-87.
- Clauson, C., Scharer, O. D. und Niedernhofer, L. (2013). "Advances in understanding the complex mechanisms of DNA interstrand cross-link repair." Cold Spring Harb Perspect Med **3**(10): a012732.

- Clough, S. J. und Bent, A. F. (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." Plant J **16**(6): 735-43.
- Collis, S. J., Ciccia, A., Deans, A. J., Horejsi, Z., Martin, J. S., Maslen, S. L., Skehel, J. M., Elledge, S. J., West, S. C. und Boulton, S. J. (2008). "FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex." Mol Cell **32**(3): 313-24.
- 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.
- Curtis, M. J. und Hays, J. B. (2007). "Tolerance of dividing cells to replication stress in UVB-irradiated *Arabidopsis* roots: requirements for DNA translesion polymerases eta and zeta." DNA Repair (Amst) **6**(9): 1341-58.
- Cybulski, K. E. und Howlett, N. G. (2011). "FANCP/SLX4: a Swiss army knife of DNA interstrand crosslink repair." Cell Cycle **10**(11): 1757-63.
- Dae, D. L., Ferrari, E., Longrich, S., Zheng, X. F., Xue, X., Branzei, D., Sung, P. und Myung, K. (2012). "Rad5-dependent DNA repair functions of the *Saccharomyces cerevisiae* FANCM protein homolog Mph1." J Biol Chem **287**(32): 26563-75.
- 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 **78**(5): 822-33.
- de los Santos, T., Hunter, N., Lee, C., Larkin, B., Loidl, J. und Hollingsworth, N. M. (2003). "The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast." Genetics **164**(1): 81-94.
- Deans, A. J. und West, S. C. (2009). "FANCM connects the genome instability disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia." Mol Cell **36**(6): 943-53.
- Dronkert, M. L., Beverloo, H. B., Johnson, R. D., Hoeijmakers, J. H., Jasin, M. und Kanaar, R. (2000). "Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange." Mol Cell Biol **20**(9): 3147-56.
- Dutta, S., Chowdhury, G. und Gates, K. S. (2007). "Interstrand cross-links generated by abasic sites in duplex DNA." J Am Chem Soc **129**(7): 1852-3.
- Eastman, A. (1987). "The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes." Pharmacol Ther **34**(2): 155-66.
- Ellis, N. A., Lennon, D. J., Proytcheva, M., Alhadeff, B., Henderson, E. E. und German, J. (1995). "Somatic intragenic recombination within the mutated locus BLM can correct the high sister-chromatid exchange phenotype of Bloom syndrome cells." Am J Hum Genet **57**(5): 1019-27.
- Epstein, C. J., Martin, G. M., Schultz, A. L. und Motulsky, A. G. (1966). "Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process." Medicine (Baltimore) **45**(3): 177-221.
- Essen, L. O. und Klar, T. (2006). "Light-driven DNA repair by photolyases." Cell Mol Life Sci **63**(11): 1266-77.
- Fanconi, G. (1927). "Familiäre infantile perniziösaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution)." In Jahrbuch für Kinderheilkunde (Berlin: Karger): pp. 257-280.
- Fontebasso, Y., Etheridge, T. J., Oliver, A. W., Murray, J. M. und Carr, A. M. (2013). "The conserved Fanconi anemia nuclease Fan1 and the SUMO E3 ligase Pli1 act in two novel Pso2-independent pathways of DNA interstrand crosslink repair in yeast." DNA Repair (Amst) **12**(12): 1011-23.
- Fransz, P., Armstrong, S., Alonso-Blanco, C., Fischer, T. C., Torres-Ruiz, R. A. und Jones, G. (1998). "Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*." Plant J **13**(6): 867-76.
- Fukui, K. (2010). "DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria." J Nucleic Acids **2010**.
- Garaycochea, J. I., Crossan, G. P., Langevin, F., Daly, M., Arends, M. J. und Patel, K. J. (2012). "Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function." Nature **489**(7417): 571-5.
- 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.
- German, J., Archibald, R. und Bloom, D. (1965). "Chromosomal Breakage in a Rare and Probably Genetically Determined Syndrome of Man." Science **148**(3669): 506-7.
- Girard, C., Crismani, W., Froger, N., Mazel, J., Lemhemdi, A., Horlow, C. und Mercier, R. (2014). "FANCM-associated proteins MHF1 and MHF2, but not the other Fanconi anemia factors, limit meiotic crossovers." Nucleic Acids Res **42**(14): 9087-95.
- Gisler, B., Salomon, S. und Puchta, H. (2002). "The role of double-strand break-induced allelic homologous recombination in somatic plant cells." Plant J **32**(3): 277-84.
- Gonzalez-Barrera, S., Cortes-Ledesma, F., Wellinger, R. E. und Aguilera, A. (2003). "Equal sister chromatid exchange is a major mechanism of double-strand break repair in yeast." Mol Cell **11**(6): 1661-71.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D. (1990). "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4645-9.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G. und Pelletier, G. (2001). "AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants." EMBO J **20**(3): 589-600.
- Gupta, R., Sharma, S., Sommers, J. A., Jin, Z., Cantor, S. B. und Brosh, R. M., Jr. (2005). "Analysis of the DNA substrate specificity of the human BACH1 helicase associated with breast cancer." J Biol Chem **280**(27): 25450-60.
- Hadjur, S. und Jirik, F. R. (2003). "Increased sensitivity of Fancc-deficient hematopoietic cells to nitric oxide and evidence that this species mediates growth inhibition by cytokines." Blood **101**(10): 3877-84.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z. und Maliga, P. (1994). "The Small, Versatile Ppzz Family of Agrobacterium Binary Vectors for Plant Transformation." Plant Mol Biol **25**(6): 989-994.
- Hanada, K., Budzowska, M., Modesti, M., Maas, A., Wyman, C., Essers, J. und Kanaar, R. (2006). "The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strand breaks." EMBO J **25**(20): 4921-32.
- Hanada, K., Budzowska, M., Davies, S. L., van Drunen, E., Onizawa, H., Beverloo, H. B., Maas, A., Essers, J., Hickson, I. D. und Kanaar, R. (2007). "The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks." Nat Struct Mol Biol **14**(11): 1096-104.
- Hartung, F. und Puchta, H. (2000). "Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in Arabidopsis thaliana." Nucleic Acids Res **28**(7): 1548-54.
- 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.
- Hata, T., Hoshi, T., Kanamori, K., Matsumae, A., Sano, Y., Shima, T. und Sugawara, R. (1956). "Mitomycin, a new antibiotic from Streptomyces. I." J Antibiot (Tokyo) **9**(4): 141-6.
- 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., Armstrong, S. J., Franklin, F. C. und Jones, G. H. (2004). "The Arabidopsis MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in Arabidopsis." Genes Dev **18**(20): 2557-70.
- Hirano, S., Yamamoto, K., Ishiai, M., Yamazoe, M., Seki, M., Matsushita, N., Ohzeki, M., Yamashita, Y. M., Arakawa, H., Buerstedde, J. M., Enomoto, T., Takeda, S., Thompson, L. H. und Takata, M. (2005). "Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM." EMBO J **24**(2): 418-27.

- Hoadley, K. A., Xue, Y., Ling, C., Takata, M., Wang, W. und Keck, J. L. (2012). "Defining the molecular interface that connects the Fanconi anemia protein FANCM to the Bloom syndrome dissolvosome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(12): 4437-42.
- Hollingsworth, N. M. und Brill, S. J. (2004). "The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions." *Genes Dev* **18**(2): 117-25.
- Huang, H., Kozekov, I. D., Kozekova, A., Wang, H., Lloyd, R. S., Rizzo, C. J. und Stone, M. P. (2010). "DNA cross-link induced by trans-4-hydroxynonenal." *Environ Mol Mutagen* **51**(6): 625-34.
- Inbar, O. und Kupiec, M. (1999). "Homology search and choice of homologous partner during mitotic recombination." *Mol Cell Biol* **19**(6): 4134-42.
- Inbar, O., Liefshitz, B., Bitan, G. und Kupiec, M. (2000). "The relationship between homology length and crossing over during the repair of a broken chromosome." *J Biol Chem* **275**(40): 30833-8.
- Initiative, A. G. (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." *Nature* **408**(6814): 796-815.
- Ionita-Laza, I., Xu, B., Makarov, V., Buxbaum, J. D., Roos, J. L., Gogos, J. A. und Karayiorgou, M. (2014). "Scan statistic-based analysis of exome sequencing data identifies FAN1 at 15q13.3 as a susceptibility gene for schizophrenia and autism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(1): 343-8.
- Ishiai, M., Kitao, H., Smogorzewska, A., Tomida, J., Kinomura, A., Uchida, E., Saberi, A., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Tashiro, S., Elledge, S. J. und Takata, M. (2008). "FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway." *Nat Struct Mol Biol* **15**(11): 1138-46.
- Iyer, L. M., Babu, M. M. und Aravind, L. (2006). "The HIRAN domain and recruitment of chromatin remodeling and repair activities to damaged DNA." *Cell Cycle* **5**(7): 775-82.
- Iyer, V. N. und Szybalski, W. (1963). "A Molecular Mechanism of Mitomycin Action: Linking of Complementary DNA Strands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **50**: 355-62.
- Jensen, R. B., Carreira, A. und Kowalczykowski, S. C. (2010). "Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination." *Nature* **467**(7316): 678-83.
- Johnson, K. M., Price, N. E., Wang, J., Fekry, M. I., Dutta, S., Seiner, D. R., Wang, Y. und Gates, K. S. (2013). "On the formation and properties of interstrand DNA-DNA cross-links forged by reaction of an abasic site with the opposing guanine residue of 5'-CAp sequences in duplex DNA." *J Am Chem Soc* **135**(3): 1015-25.
- Jones, G. H. (1984). "The control of chiasma distribution." *Symp Soc Exp Biol* **38**: 293-320.
- Kadyk, L. C. und Hartwell, L. H. (1992). "Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **132**(2): 387-402.
- Kaliraman, V., Mullen, J. R., Fricke, W. M., Bastin-Shanower, S. A. und Brill, S. J. (2001). "Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease." *Genes Dev* **15**(20): 2730-40.
- Kamileri, I., Karakasilioti, I. und Garinis, G. A. (2012). "Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks." *Trends Genet* **28**(11): 566-73.
- Keeney, S., Giroux, C. N. und Kleckner, N. (1997). "Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family." *Cell* **88**(3): 375-84.
- Kelland, L. R. (1993). "New platinum antitumor complexes." *Crit Rev Oncol Hematol* **15**(3): 191-219.
- Kim, H., Yang, K., Dejsuphong, D. und D'Andrea, A. D. (2012). "Regulation of Rev1 by the Fanconi anemia core complex." *Nat Struct Mol Biol* **19**(2): 164-70.
- Kim, J. M., Kee, Y., Gurtan, A. und D'Andrea, A. D. (2008). "Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24." *Blood* **111**(10): 5215-22.
- 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, H. und Takata, M. (2011). "Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response." *Int J Hematol* **93**(4): 417-24.
- Kitao, S., Lindor, N. M., Shiratori, M., Furuichi, Y. und Shimamoto, A. (1999). "Rothmund-thomson syndrome responsible gene, RECQL4: genomic structure and products." *Genomics* **61**(3): 268-76.
- Klein Douwel, D., Boonen, R. A., Long, D. T., Szybowska, A. A., Raschle, M., Walter, J. C. und Knipscheer, P. (2014). "XPF-ERCC1 acts in Unhooking DNA interstrand crosslinks in cooperation with FANCD2 and FANCP/SLX4." *Mol Cell* **54**(3): 460-71.

- Klimyuk, V. I. und Jones, J. D. (1997). "AtDMC1, the Arabidopsis homologue of the yeast DMC1 gene: characterization, transposon-induced allelic variation and meiosis-associated expression." *Plant J* **11**(1): 1-14.
- 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., 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.
- Köhler, L. (2014). "Charakterisierung der DNA-Reparaturfaktoren AtABRH und AtFANCB in *Arabidopsis thaliana*." *Botanisches Institut II, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- Komori, K., Fujikane, R., Shinagawa, H. und Ishino, Y. (2002). "Novel endonuclease in Archaea cleaving DNA with various branched structure." *Genes Genet Syst* **77**(4): 227-41.
- Koncz, C., Kreuzaler, F., Kalman, Z. und Schell, J. (1984). "A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumors." *EMBO J* **3**(5): 1029-37.
- Kratz, K., Schopf, B., Kaden, S., Sendoel, A., Eberhard, R., Lademann, C., Cannavo, E., Sartori, A. A., Hengartner, M. O. und Jiricny, J. (2010). "Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents." *Cell* **142**(1): 77-88.
- Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M. S., Klein, H., Ellenberger, T. und Sung, P. (2003). "DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament." *Nature* **423**(6937): 305-9.
- Kumar, S., Lipman, R. und Tomasz, M. (1992). "Recognition of specific DNA sequences by mitomycin C for alkylation." *Biochemistry* **31**(5): 1399-407.
- Lai, F., Hu, K., Wu, Y., Tang, J., Sang, Y., Cao, J. und Kang, T. (2012). "Human KIAA1018/FAN1 nuclease is a new mitotic substrate of APC/C(Cdh1)." *Chin J Cancer* **31**(9): 440-8.
- 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.
- Leung, J. W., Wang, Y., Fong, K. W., Huen, M. S., Li, L. und Chen, J. (2012). "Fanconi anemia (FA) binding protein FAAP20 stabilizes FA complementation group A (FANCA) and participates in interstrand cross-link repair." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(12): 4491-6.
- Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B. C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W. W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Rooimans, M. A., Pals, G., Arwert, F., Mathew, C. G., Zdzienicka, M. Z., Hiom, K., De Winter, J. P. und Joenje, H. (2005). "The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J." *Nat Genet* **37**(9): 934-5.
- Levrin, O., Attwooll, C., Henry, R. T., Milton, K. L., Neveling, K., Rio, P., Batish, S. D., Kalb, R., Velleuer, E., Barral, S., Ott, J., Petrini, J., Schindler, D., Hanenberg, H. und Auerbach, A. D. (2005). "The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia." *Nat Genet* **37**(9): 931-3.
- Li, W., Chen, C., Markmann-Mulisch, U., Timofejeva, L., Schmelzer, E., Ma, H. und Reiss, B. (2004). "The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29): 10596-601.
- 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.
- Ling, C., Ishiai, M., Ali, A. M., Medhurst, A. L., Neveling, K., Kalb, R., Yan, Z., Xue, Y., Oostra, A. B., Auerbach, A. D., Hoatlin, M. E., Schindler, D., Joenje, H., de Winter, J. P., Takata, M., Meetei, A. R. und Wang, W. (2007). "FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway." *EMBO J* **26**(8): 2104-14.
- Litman, R., Peng, M., Jin, Z., Zhang, F., Zhang, J., Powell, S., Andreassen, P. R. und Cantor, S. B. (2005). "BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCB." *Cancer Cell* **8**(3): 255-65.
- Liu, T., Ghosal, G., Yuan, J., Chen, J. und Huang, J. (2010). "FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair." *Science* **329**(5992): 693-6.

- Lorenz, A., Osman, F., Sun, W., Nandi, S., Steinacher, R. und Whitby, M. C. (2012). "The fission yeast FANCM ortholog directs non-crossover recombination during meiosis." *Science* **336**(6088): 1585-8.
- Ma, H. (2005). "Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants." *Annu Rev Plant Biol* **56**: 393-434.
- Ma, J. L., Kim, E. M., Haber, J. E. und Lee, S. E. (2003). "Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences." *Mol Cell Biol* **23**(23): 8820-8.
- MacKay, C., Toth, R. und Rouse, J. (2009). "Biochemical characterisation of the SWI/SNF family member HLTF." *Biochem Biophys Res Commun* **390**(2): 187-91.
- MacKay, C., Declais, A. C., Lundin, C., Agostinho, A., Deans, A. J., MacArtney, T. J., Hofmann, K., Gartner, A., West, S. C., Helleday, T., Lilley, D. M. und Rouse, J. (2010). "Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2." *Cell* **142**(1): 65-76.
- Magana-Schwencke, N., Henriques, J. A., Chanet, R. und Moustacchi, E. (1982). "The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(6): 1722-6.
- 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.
- McVey, M. und Lee, S. E. (2008). "MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings." *Trends Genet* **24**(11): 529-38.
- McVey, M. (2010). "Strategies for DNA interstrand crosslink repair: insights from worms, flies, frogs, and slime molds." *Environ Mol Mutagen* **51**(6): 646-58.
- Medhurst, A. L., Laghmani el, H., Steltenpool, J., Ferrer, M., Fontaine, C., de Groot, J., Rooimans, M. A., Scheper, R. J., Meetei, A. R., Wang, W., Joenje, H. und de Winter, J. P. (2006). "Evidence for subcomplexes in the Fanconi anemia pathway." *Blood* **108**(6): 2072-80.
- Meetei, A. R., Levitus, M., Xue, Y., Medhurst, A. L., Zwaan, M., Ling, C., Rooimans, M. A., Bier, P., Hoatlin, M., Pals, G., de Winter, J. P., Wang, W. und Joenje, H. (2004). "X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B." *Nat Genet* **36**(11): 1219-24.
- Meetei, A. R., Medhurst, A. L., Ling, C., Xue, Y., Singh, T. R., Bier, P., Steltenpool, J., Stone, S., Dokal, I., Mathew, C. G., Hoatlin, M., Joenje, H., de Winter, J. P. und Wang, W. (2005). "A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M." *Nat Genet* **37**(9): 958-63.
- Mimitou, E. P. und Symington, L. S. (2008). "Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing." *Nature* **455**(7214): 770-4.
- Moldovan, G. L. und D'Andrea, A. D. (2009). "How the fanconi anemia pathway guards the genome." *Annu Rev Genet* **43**: 223-49.
- Molinier, J., Ries, G., Bonhoeffer, S. und Hohn, B. (2004). "Interchromatid and interhomolog recombination in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* **16**(2): 342-52.
- Motegi, A., Sood, R., Moinova, H., Markowitz, S. D., Liu, P. P. und Myung, K. (2006). "Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination." *J Cell Biol* **175**(5): 703-8.
- Motegi, A., Liaw, H. J., Lee, K. Y., Roest, H. P., Maas, A., Wu, X., Moinova, H., Markowitz, S. D., Ding, H., Hoeijmakers, J. H. und Myung, K. (2008). "Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(34): 12411-6.
- 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.
- 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.
- Niedzwiedz, W., Mosedale, G., Johnson, M., Ong, C. Y., Pace, P. und Patel, K. J. (2004). "The Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair." *Mol Cell* **15**(4): 607-20.

- Nishino, T., Takeuchi, K., Gascoigne, K. E., Suzuki, A., Hori, T., Oyama, T., Morikawa, K., Cheeseman, I. M. und Fukagawa, T. (2012). "CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold." *Cell* **148**(3): 487-501.
- Orel, N., Kyryk, A. und Puchta, H. (2003). "Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome." *Plant J* **35**(5): 604-12.
- Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., Yamamoto, M. und Igarashi, K. (1996). "Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site." *Mol Cell Biol* **16**(11): 6083-95.
- Pagano, G., Talamanca, A. A., Castello, G., Pallardo, F. V., Zatterale, A. und Degan, P. (2012). "Oxidative stress in Fanconi anaemia: from cells and molecules towards prospects in clinical management." *Biol Chem* **393**(1-2): 11-21.
- Page, S. L. und Hawley, R. S. (2004). "The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex." *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 525-58.
- Palom, Y., Suresh Kumar, G., Tang, L. Q., Paz, M. M., Musser, S. M., Rockwell, S. und Tomasz, M. (2002). "Relative toxicities of DNA cross-links and monoadducts: new insights from studies of decarbamoyl mitomycin C and mitomycin C." *Chem Res Toxicol* **15**(11): 1398-406.
- Patel, K. J. und Joenje, H. (2007). "Fanconi anemia and DNA replication repair." *DNA Repair (Amst)* **6**(7): 885-90.
- Pennell, S., Declais, A. C., Li, J., Haire, L. F., Berg, W., Saldanha, J. W., Taylor, I. A., Rouse, J., Lilley, D. M. und Smerdon, S. J. (2014). "FAN1 activity on asymmetric repair intermediates is mediated by an atypical monomeric virus-type replication-repair nuclease domain." *Cell Rep* **8**(1): 84-93.
- Phillips, D. H. (1996). "DNA adducts in human tissues: biomarkers of exposure to carcinogens in tobacco smoke." *Environ Health Perspect* **104 Suppl 3**: 453-8.
- Pichierri, P., Franchitto, A. und Rosselli, F. (2004). "BLM and the FANC proteins collaborate in a common pathway in response to stalled replication forks." *EMBO J* **23**(15): 3154-63.
- Pinto, A. L. und Lippard, S. J. (1985). "Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA." *Biochim Biophys Acta* **780**(3): 167-80.
- 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, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., Krejci, L., Klein, H., Haber, J. E., Sung, P. und Ira, G. (2009). "Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination." *Genes Dev* **23**(1): 67-79.
- 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. (1999). "Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells." *Genetics* **152**(3): 1173-81.
- Puchta, H. (2005). "The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution." *J Exp Bot* **56**(409): 1-14.
- Puizina, J., Siroky, J., Mokros, P., Schweizer, D. und Riha, K. (2004). "Mre11 deficiency in Arabidopsis is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis." *Plant Cell* **16**(8): 1968-78.
- Punta, M., Coghill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., Bateman, A. und Finn, R. D. (2012). "The Pfam protein families database." *Nucleic Acids Res* **40**(Database issue): D290-301.
- Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., Reid, S., Spanova, K., Barfoot, R., Chagtai, T., Jayatilake, H., McGuffog, L., Hanks, S., Evans, D. G., Eccles, D., Easton, D. F. und Stratton, M. R. (2007). "PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene." *Nat Genet* **39**(2): 165-7.
- Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, M., Wurm, M., Batish, S. D., Lach, F. P., Yetgin, S., Neitzel, H., Ariffin, H., Tischkowitz, M., Mathew, C. G., Auerbach, A. D. und Rahman, N. (2007). "Biallelic

- mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer." *Nat Genet* **39**(2): 162-4.
- Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T. und Leiros, I. (2009). "DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it." *Cell Mol Life Sci* **66**(6): 981-93.
- Rosenberg, B., Vancamp, L. und Krigas, T. (1965). "Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode." *Nature* **205**: 698-9.
- Rosenberg, P. S., Tamary, H. und Alter, B. P. (2011). "How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel." *Am J Med Genet A* **155A**(8): 1877-83.
- Ross-Macdonald, P. und Roeder, G. S. (1994). "Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction." *Cell* **79**(6): 1069-80.
- 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.
- Salomon, S. und Puchta, H. (1998). "Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells." *EMBO J* **17**(20): 6086-95.
- Sanchez Moran, E., Armstrong, S. J., Santos, J. L., Franklin, F. C. und Jones, G. H. (2001). "Chiasma formation in Arabidopsis thaliana accession Wassileskija and in two meiotic mutants." *Chromosome Res* **9**(2): 121-8.
- 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.
- Schneitz, K., Hulskamp, M., Kopczak, S. D. und Pruitt, R. E. (1997). "Dissection of sexual organ ontogenesis: a genetic analysis of ovule development in Arabidopsis thaliana." *Development* **124**(7): 1367-76.
- Schroeder, T. M., Anschuetz, F. und Knopp, A. (1964). "Spontane Chromosomenaberrationen bei familiärer Panmyelopathie." *Human Genetics* **1**(2): 194-196.
- 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.
- Schwab, R. A., Nieminuszczy, J., Shin-ya, K. und Niedzwiedz, W. (2013). "FANCI couples replication past natural fork barriers with maintenance of chromatin structure." *J Cell Biol* **201**(1): 33-48.
- Seeliger, K., Dukowic-Schulze, S., Wurz-Wildersinn, R., Pacher, M. und Puchta, H. (2012). "BRCA2 is a mediator of RAD51- and DMC1-facilitated homologous recombination in Arabidopsis thaliana." *New Phytol* **193**(2): 364-75.
- Shalev, G. und Levy, A. A. (1997). "The maize transposable element Ac induces recombination between the donor site and an homologous ectopic sequence." *Genetics* **146**(3): 1143-51.
- Shinohara, A. und Shinohara, M. (2004). "Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination." *Cytogenet Genome Res* **107**(3-4): 201-7.
- Siddik, Z. H. (2003). "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance." *Oncogene* **22**(47): 7265-79.
- Siebert, R. und Puchta, H. (2002). "Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome." *Plant Cell* **14**(5): 1121-31.
- Singh, T. R., Saro, D., Ali, A. M., Zheng, X. F., Du, C. H., Killen, M. W., Sachpatzidis, A., Wahengbam, K., Pierce, A. J., Xiong, Y., Sung, P. und Meetei, A. R. (2010). "MHF1-MHF2, a histone-fold-containing protein complex, participates in the Fanconi anemia pathway via FANCM." *Mol Cell* **37**(6): 879-86.
- Smith, G. R., Boddy, M. N., Shanahan, P. und Russell, P. (2003). "Fission yeast Mus81.Eme1 Holliday junction resolvase is required for meiotic crossing over but not for gene conversion." *Genetics* **165**(4): 2289-93.
- Smogorzewska, A., Desetty, R., Saito, T. T., Schlabach, M., Lach, F. P., Sowa, M. E., Clark, A. B., Kunkel, T. A., Harper, J. W., Colaiacovo, M. P. und Elledge, S. J. (2010). "A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair." *Mol Cell* **39**(1): 36-47.

- Smyth, D. R., Bowman, J. L. und Meyerowitz, E. M. (1990). "Early flower development in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **2**(8): 755-67.
- Stone, M. P., Cho, Y. J., Huang, H., Kim, H. Y., Kozekov, I. D., Kozekova, A., Wang, H., Minko, I. G., Lloyd, R. S., Harris, T. M. und Rizzo, C. J. (2008). "Interstrand DNA cross-links induced by alpha,beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources." *Acc Chem Res* **41**(7): 793-804.
- Sugahara, R., Mon, H., Lee, J. M. und Kusakabe, T. (2014). "Middle region of FancM interacts with Mhf and Rmi1 in silkworms, a species lacking the Fanconi anaemia (FA) core complex." *Insect Mol Biol* **23**(2): 185-98.
- Suhasini, A. N., Sommers, J. A., Muniandy, P. A., Coulombe, Y., Cantor, S. B., Masson, J. Y., Seidman, M. M. und Brosh, R. M., Jr. (2013). "Fanconi anemia group J helicase and MRE11 nuclease interact to facilitate the DNA damage response." *Mol Cell Biol* **33**(11): 2212-27.
- Sun, W., Nandi, S., Osman, F., Ahn, J. S., Jakovleska, J., Lorenz, A. und Whitby, M. C. (2008). "The FANCM ortholog Fml1 promotes recombination at stalled replication forks and limits crossing over during DNA double-strand break repair." *Mol Cell* **32**(1): 118-28.
- Sy, S. M., Huen, M. S. und Chen, J. (2009). "PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(17): 7155-60.
- 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.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. und Kumar, S. (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0." *Mol Biol Evol* **30**(12): 2725-9.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Andreassen, P. R., Gregory, R. C., Grompe, M. und D'Andrea, A. D. (2002). "S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51." *Blood* **100**(7): 2414-20.
- Tao, Y., Jin, C., Li, X., Qi, S., Chu, L., Niu, L., Yao, X. und Teng, M. (2012). "The structure of the FANCM-MHF complex reveals physical features for functional assembly." *Nat Commun* **3**: 782.
- 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.
- Ulrich, H. D. und Walden, H. (2010). "Ubiquitin signalling in DNA replication and repair." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(7): 479-89.
- Unk, I., Hajdu, I., Fatyol, K., Szakal, B., Blastyak, A., Bermudez, V., Hurwitz, J., Prakash, L., Prakash, S. und Haracska, L. (2006). "Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18107-12.
- 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.
- Wang, W. (2007). "Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins." *Nat Rev Genet* **8**(10): 735-48.
- Ward, T. A., Dudasova, Z., Sarkar, S., Bhide, M. R., Vlasakova, D., Chovanec, M. und McHugh, P. J. (2012). "Components of a Fanconi-like pathway control Pso2-independent DNA interstrand crosslink repair in yeast." *PLoS Genet* **8**(8): e1002884.
- Waterworth, W. M., Altun, C., Armstrong, S. J., Roberts, N., Dean, P. J., Young, K., Weil, C. F., Bray, C. M. und West, C. E. (2007). "NBS1 is involved in DNA repair and plays a synergistic role with ATM in mediating meiotic homologous recombination in plants." *Plant J* **52**(1): 41-52.
- Watson, J. D. und Crick, F. H. (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." *Nature* **171**(4356): 737-8.
- Whitby, M. C. (2010). "The FANCM family of DNA helicases/translocases." *DNA Repair (Amst)* **9**(3): 224-36.
- Woody, S. T., Austin-Phillips, S., Amasino, R. M. und Krysan, P. J. (2007). "The WiseDsLox T-DNA collection: an arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline." *J Plant Res* **120**(1): 157-65.
- Wu, L. und Hickson, I. D. (2003). "The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination." *Nature* **426**(6968): 870-4.

- Xue, Y., Li, Y., Guo, R., Ling, C. und Wang, W. (2008). "FANCM of the Fanconi anemia core complex is required for both monoubiquitination and DNA repair." *Hum Mol Genet* **17**(11): 1641-52.
- Yan, Z., Delannoy, M., Ling, C., Dae, D., Osman, F., Muniandy, P. A., Shen, X., Oostra, A. B., Du, H., Steltenpool, J., Lin, T., Schuster, B., Decaillet, C., Stasiak, A., Stasiak, A. Z., Stone, S., Hoatlin, M. E., Schindler, D., Woodcock, C. L., Joenje, H., Sen, R., de Winter, J. P., Li, L., Seidman, M. M., Whitby, M. C., Myung, K., Constantinou, A. und Wang, W. (2010). "A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability." *Mol Cell* **37**(6): 865-78.
- 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.
- Zhang, F., Fan, Q., Ren, K., Auerbach, A. D. und Andreassen, P. R. (2010). "FANCI/BRIP1 recruitment and regulation of FANCD2 in DNA damage responses." *Chromosoma* **119**(6): 637-49.
- Zhang, Y., Hefferin, M. L., Chen, L., Shim, E. Y., Tseng, H. M., Kwon, Y., Sung, P., Lee, S. E. und Tomkinson, A. E. (2007). "Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination." *Nat Struct Mol Biol* **14**(7): 639-46.
- Zhao, Q., Saro, D., Sachpatzidis, A., Singh, T. R., Schlingman, D., Zheng, X. F., Mack, A., Tsai, M. S., Mochrie, S., Regan, L., Meetei, A. R., Sung, P. und Xiong, Y. (2014). "The MHF complex senses branched DNA by binding a pair of crossover DNA duplexes." *Nat Commun* **5**: 2987.
- Zhou, W., Otto, E. A., Cluckey, A., Airik, R., Hurd, T. W., Chaki, M., Diaz, K., Lach, F. P., Bennett, G. R., Gee, H. Y., Ghosh, A. K., Natarajan, S., Thongthip, S., Veturi, U., Allen, S. J., Janssen, S., Ramaswami, G., Dixon, J., Burkhalter, F., Spoendlin, M., Moch, H., Mihatsch, M. J., Verine, J., Reade, R., Soliman, H., Godin, M., Kiss, D., Monga, G., Mazzucco, G., Amann, K., Artunc, F., Newland, R. C., Wiech, T., Zschiedrich, S., Huber, T. B., Friedl, A., Slaats, G. G., Joles, J. A., Goldschmeding, R., Washburn, J., Giles, R. H., Levy, S., Smogorzewska, A. und Hildebrandt, F. (2012). "FAN1 mutations cause karyomegalic interstitial nephritis, linking chronic kidney failure to defective DNA damage repair." *Nat Genet* **44**(8): 910-5.
- 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

Tabelle 8.1: Verwendete Primer zur Genotypisierung.

Die Tabelle enthält alle in dieser Arbeit zur Genotypisierung verwendeten Primer mit Angabe der Sequenzen in 5'-3' Richtung.

Primername	Sequenz (5'-3')
MHF1-1	AGTGAAGTCCGTGCCGC
MHF1-R1	CCACACATGCCACAACAG
FAN1-R2	GAAGCAGGTCTTACTTTGC
FAN1-2	GCAAAGGCGGATTCTTCG
RAD5A-fw	GCGTCTTCGACAATGTTGTG
RAD5A-rev	CAGGATACTGCCATCTTCGG
MPH1-1	GGATCTAGGGTTCCAATAG
MPH1-R1	CCTCAATCTGCTGCATCAC
MUS81-1	AGTGAATCTGATAGTGAG
MUS?R2	GCAGCATCAATAAGCTCTTG
RQ4A-(-2A)	GTCCTGATCGTGTTGGACAG
RQ4A-R6A	ATCAGAGCCACTCATTGTTG
BACH1A-fw	CTTGGGAAAGACAATGTAGATGATG
BACH1A-rev	GTATGCGTCCAGGTACCAG
LB1	GACCATCATACTCATTGC
LBd1	TCGGAACCACCATCAAAC
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
P745s	CCGCAATGTGTTATTAAGTTG
IC9C-fw	ACTGAGTTTGGTAACCTGTG
IC9C-rev	CCAGAAGTAAAAGTGAAGTTC

Tabelle 8.2: Verwendete Primerkombinationen und PCR-Bedingungen zur Genotypisierung.

Zur Genotypisierung der in dieser Arbeit verwendeten Mutantenlinien wurden jeweils zwei verschiedene PCR-Reaktionen durchgeführt. Zur Bestimmung des Wildtyp-Locus wurden dafür zwei Gen-spezifische Primer verwendet. Zur Bestimmung der T-DNA Insertion wurde ein T-DNA spezifischer und ein Gen-spezifischer Primer verwendet. In dieser Tabelle sind pro Linie zuerst die Bedingungen für die Genotypisierung des Wildtyp-Locus und direkt darunter die Bedingungen der Genotypisierung der T-DNA Insertion aufgeführt. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 8.1 dargestellt.

Linie	Primerkombination	ungefähre Produktgröße	Annealing-Temperatur
<i>mhf1-1</i>	MHF1-1 / MHF1-R1	1000 bp	56 °C
	LBd1 / MHF1-1	1000 bp	56 °C
<i>mhf1-2</i>	MHF1-1 / MHF1-R1	1000 bp	56 °C
	p745s / MHF1-1	750 bp	56 °C
<i>fan1-1</i>	FAN1-2 / FAN1-R2	600 bp	56 °C
	LB1 / FAN1-2	600 bp	56 °C
<i>rad5A-2</i>	RAD5A-fw / RAD5A-rev	600 bp	56 °C
	LBb1.3 / RAD5A-rev	1000 bp	54 °C
<i>fancm-1</i>	MPH1-1 / MPH1-R1	700 bp	56 °C
	LBd1 / MPH1-1	600 bp	56 °C
<i>mus81-1</i>	MUS81-1 / MUS?-R2	700 bp	56 °C
	LB1 / MUS?-R2	700 bp	56 °C
<i>recq4A-4</i>	RQ2-R6a / RQ2-(-2A)	1000 bp	56 °C
	LB1 / RQ2-R6a	500 bp	56 °C
<i>fancjb-1</i>	BACH1A-fw / BACH1A-rev	2000 bp	56 °C
	LBb1.3 / BACH1A-rw	1000 bp	56 °C
IC9C	IC9C-fw / IC9C-rev	250 bp	56 °C
	LB1 / IC9C-fw	250 bp	56 °C

Tabelle 8.3: Verwendete Primer für Expressionsanalysen und zur Klonierung der FAN1 Konstrukte.

Die verwendeten Primer für Expressionanalyse von MHF1 beziehungsweise FAN1 in den Mutantenlinien, sowie die Primer, die zur Klonierung der FAN1 Konstrukte verwendet wurden, sind in dieser Tabelle aufgelistet. Die jeweilige Verwendung, der Primernamen und die Sequenz in 5'-3' Richtung sind ebenfalls angegeben.

Verwendung	Primernamen	Sequenz (5'-3')
Expressionsanalyse von <i>MHF1</i> in <i>mhf1-1</i> und <i>mhf1-2</i>	MHF1-Ex1-fw	CCTAACATCGGTAACAAGC
	MHF1-Ex2-fw	GACCAAATCGTTGAAGAATAT
	MHF1-Ex2-rev	ATATTCTTCAACGATTTGGTC
	MHF1-Ex4-rev	GCGTCCAGCATGATGAGC

Verwendung	Primernamen	Sequenz (5'-3')
Expressionsanalyse von <i>FAN1</i> in <i>fan1-1</i>	FAN1-RT1-fw	GGATTTCCTGCTTCACGGCTGGC
	FAN1-RT0-rev	CAATAGTCCCTGCTCTGC
	FAN1_RT_fw	CAGTGGAGAAGGAGGAGG
	FAN1_RT-rev	CTCCAAGCCACTCCTCT
	FAN1-RT2-fw	GAGGTATGTGTATAGCATCG
	FAN1-RT3-rev	CATTAGAAGTAGAAGCCAAG
Genspezifische cDNA Synthese	Actin2-RT-rev	GCTCAGGCGCAATCACG
	IC9C-FH-RT	GAAACAGCTATGACATGATTAC
Qualitätskontrolle der cDNA	β -Tubulin-fw	CCTGATAACTTCGTCTTTGG
	β -Tubulin-rev	GTCAACTCCATCTCGTCCAT
Expressionsanalyse des Haushaltgens <i>ACTIN2</i>	Actin2-FW	CAGATGCCCAGAAGTCTTG
	Actin2-REV	GTGCTGTGATTTCTTTGCTC
Expressionsanalyse des <i>GUS</i> Gens	GUS-651-NT-RT-fw	GATCATCTACTTCTGAAGACTC
	GUS-651-NT-RT-rev	CTGCCTGGCACAGCAATTG
Klonierung der <i>FAN1</i> Konstrukte	FAN1-Prom-fw1	CCGTCGTTTTCTTTCCCTTG
	FAN1-Term-rev	AGATCTGCGAAATAAGAGAG
	FAN1-Del-Nuc(1)-fw	GGAATGCCTGCTCTACTG
	FAN1-Del-Nuc(1)-rev	CAGTAGAGCAGGCATTCC
	Nuc2-1-fw neu	GCTTGTGGAAGTGGCTTCAGAGAA AGATAG
	Nuc2-1 rev neu	CTATCTTTCTCTGAAGCCACTTCCA CAAGC
	FAN1-UBZ-Del(2)-fw	AAGAAACGGAGATTAACTCAG
	FAN1-UBZ-Del(1)-rev	ATCATCTCCGGCTAATGAG
	FAN1-UBZ-Del(2)-fw-(1) ÜH	CTCATTAGCCGGAGAAAGAAACGG AGATTAACTCAG
	FAN1-Prom-fw1_InFusion	ACGCGTCCATGGTTAATTAACCGTC GTTTTCTTTCCCTTG
	FAN1-Term-rev_InFusion	CACTAGTCGGTCCGGACGTCAGATC TGCGAAATAAGAGAG

Tabelle 8.4: Verwendete Primer für die 5' RACE PCR.

In der Tabelle sind die für die exakte Bestimmung des 5' Endes von *MHF1* durch 5' RACE PCR verwendeten Primer aufgelistet.

Primername	Sequenz (5'-3')
GSP1	GAACGGCATTGCTACTACTG
GSP2	TTAGCTCATTGCATAGTGACCTC
GSP3	GCTGCTAAGTTATCGTTTCTATGC
Ü1	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGG
Ü2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC

Tabelle 8.5: Relative Expression von *AtMHF1*.

In der Tabelle sind die Werte der relativen Expression von *MHF1* in den Mutantenlinien *mhf1-1* und *mhf1-2* dargestellt. Zur Normalisierung diente das Haushaltsgen *ACTIN2*.

Versuch Nr.	über die T-DNA			3' der T-DNA		
	WT	<i>mhf1-1</i>	<i>mhf1-2</i>	WT	<i>mhf1-1</i>	<i>mhf1-2</i>
1	1	0,00015	0,5286	1	7,545	1,086
2	1	0,00016	0,106	1	4,644	0,6062
3	1	0,00143	0,125	1	1,32	0,8723

Tabelle 8.6: Sensitivität von *mhf1-1* und *mhf1-2* gegenüber Bleomycin.

Die Linien *mhf1-1*, *mhf1-2*, sowie der Wildtyp wurden mit 0,5, 1, 2 und 5 µg/ml Bleomycin (Bleo) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.1 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	0,5	1	2	5 µg/ml Bleo
WT	77,47	59,88	32,99	14,53
	68,52	45,13	23,48	16,08
	62,30	42,62	32,79	29,51
Mittelwert	69,43	49,21	29,76	20,04
SD	7,63	9,33	5,43	8,24
<i>mhf1-1</i>	83,44	58,85	27,43	10,38
	72,67	41,69	22,63	16,28
	78,13	54,38	24,38	17,50
Mittelwert	78,08	51,64	24,81	14,72
SD	5,38	8,90	2,43	3,81
<i>mhf1-2</i>	81,22	77,06	21,05	10,79
	64,53	41,50	20,24	17,92
	53,52	42,25	47,89	36,62
Mittelwert	66,42	53,61	29,73	21,78
SD	13,95	10,00	15,73	13,34

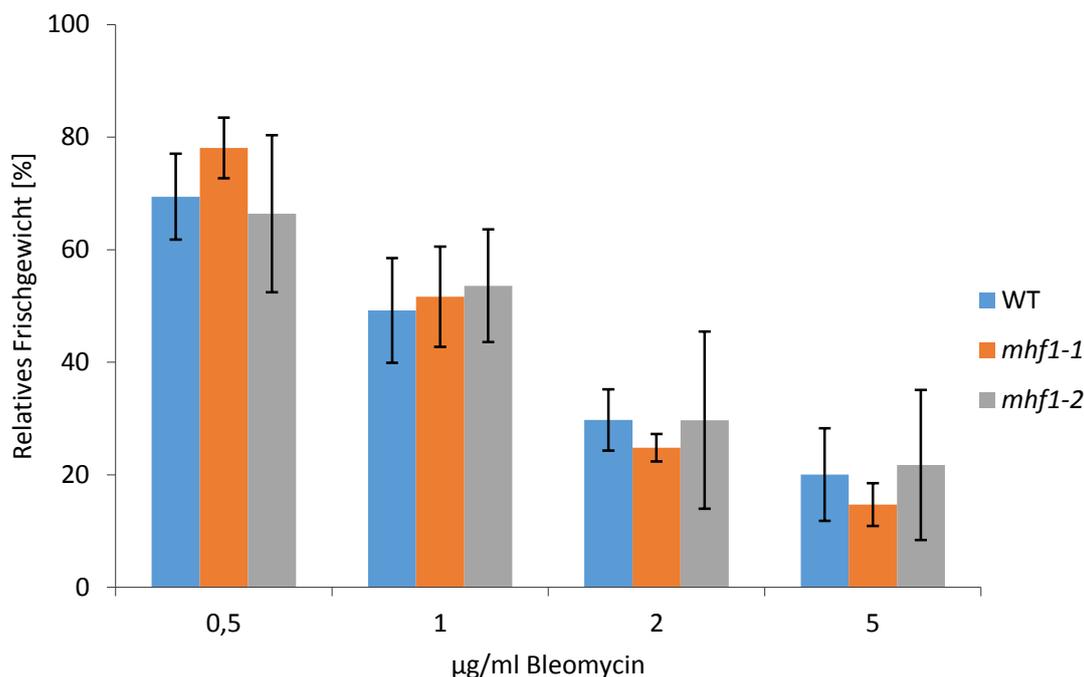


Abbildung 8.1: Sensitivität von *mhfl-1* und *mhfl-2* gegenüber Bleomycin.

Die Einzelmutanten *mhfl-1*, *mhfl-2*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 0,5, 1, 2 und 5 µg/ml Bleomycin behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabelle 8.7: Sensitivität von *mhfl-1* und *mhfl-2* gegenüber *cis*-Platin.

Die Linien *mhfl-1*, *mhfl-2*, sowie der Wildtyp wurden mit 5 und 10 µM *cis*-Platin behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.2 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei	
	5	10
WT	106,20	76,68
	96,08	91,44
	114,16	106,42
	126,60	109,65
	101,56	83,42
	92,76	80,31
	107,8	93,8
	87,03	83,39
	86,46	60,02
	87,32	88,52
	121,25	124,97
	123,11	111,27
	Mittelwert	104,19
SD	14,66	17,92

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei	
	5	10
<i>mhf1-1</i>	111,83	96,20
	107,38	89,39
	101,45	80,16
	100,97	82,74
	92,16	73,41
	50,30	48,81
	118,37	68,62
	116,25	72,25
111,83	96,20	
Mittelwert	99,84	76,45
SD	21,81	14,46
<i>mhf1-2</i>	84,90	54,32
	82,71	59,42
	100,12	78,62
	101,02	94,42
	102,94	78,17
	92,14	76,24
	102,74	81,20
	97,79	87,38
	113,95	95,68
	113,35	109,08
Mittelwert	99,17	81,45
SD	10,42	16,45

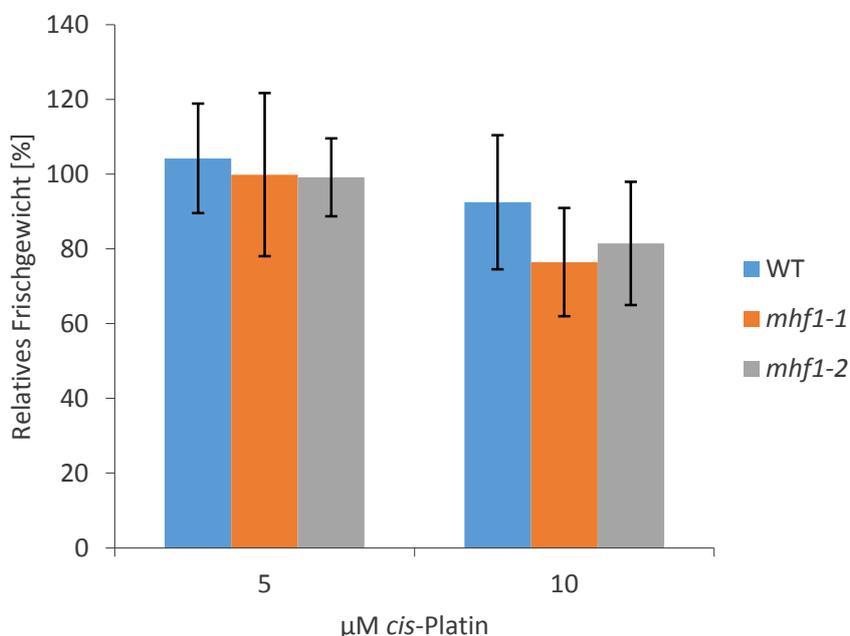


Abbildung 8.2: Sensitivität von *mhf1-1* und *mhf1-2* gegenüber *cis*-Platin.

Die Einzelmutanten *mhf1-1*, *mhf1-2*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5 und 10 µM *cis*-Platin behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabelle 8.8: Sensitivität von *mhfl-1* und *mhfl-2* gegenüber Mitomycin C.

Die Linien *mhfl-1*, *mhfl-2*, sowie der Wildtyp wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	20	40	60	100 ppm MMS
WT	82,21	60,82	31,53	32,10
	93,89	62,46	50,57	26,79
	80,33	59,32	49,74	24,72
	60,21	67,94	46,71	50,53
Mittelwert	79,16	62,63	44,64	33,53
SD	13,98	3,76	8,89	11,75
<i>mhfl-1</i>	59,85	49,80	22,54	24,38
	91,54	58,74	47,78	36,58
	67,35	66,17	25,31	16,94
	94,77	41,92	62,15	35,72
Mittelwert	78,38	54,16	39,45	28,41
SD	17,39	10,55	18,89	9,45
<i>mhfl-2</i>	81,74	61,39	41,71	45,31
	79,05	56,21	50,86	31,28
	79,89	56,15	36,44	25,93
	78,74	66,18	40,96	36,23
Mittelwert	79,86	59,98	42,49	34,69
SD	1,35	4,80	6,04	8,24

Tabelle 8.9: Sensitivität von *mhfl-1* und *mhfl-2* gegenüber Methylmethansulfonat.

Die Linien *mhfl-1*, *mhfl-2*, sowie der Wildtyp wurden mit 20, 40, 60, 100 ppm Methylmethansulfonat (MMS) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.3 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	20	40	60	100 ppm MMS
WT	70,77	57,85	40,00	13,13
	81,57	47,33	30,10	6,11
	93,74	76,07	49,57	19,14
Mittelwert	82,03	60,42	39,89	12,79
SD	11,49	14,54	9,74	6,52
<i>mhfl-1</i>	62,88	64,72	38,13	12,04
	74,40	74,40	36,31	6,15
	82,27	61,27	49,52	13,87
Mittelwert	73,18	66,80	41,32	10,69
SD	9,76	6,81	7,16	4,03
<i>mhfl-2</i>	76,92	61,54	51,35	16,22
	84,17	46,30	33,25	9,23
	77,05	56,53	32,65	13,43
Mittelwert	79,38	54,79	39,08	12,96
SD	4,15	7,77	10,63	3,52

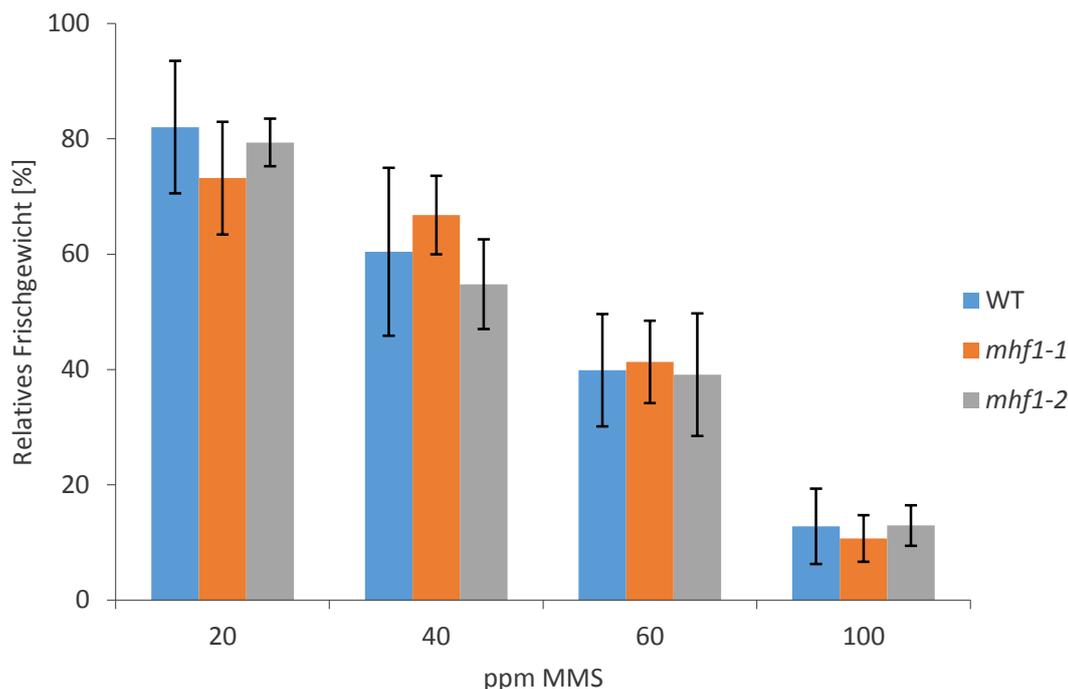


Abbildung 8.3: Sensitivität von *mhfl-1* und *mhfl-2* gegenüber Methylmethansulfonat.

Die Einzelmutanten *mhfl-1*, *mhfl-2*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 20, 40, 60 und 100 ppm Methylmethansulfonat (MMS) behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabelle 8.10: Sensitivität von *mhfl-1* und *mhfl-2* gegenüber Hydroxyurea.

Die Linien *mhfl-1*, *mhfl-2*, sowie der Wildtyp wurden mit 0,5, 1, 2, 4 mM Hydroxyurea (HU) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.4 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	0,5	1	2	4 mM HU
WT	77,47	59,88	32,99	14,53
	97,4	82,5	42,5	18,2
	99,2	78,9	44,0	9,5
Mittelwert	91,35	73,75	39,83	14,08
SD	12,05	12,14	5,96	4,34
<i>mhfl-1</i>	83,44	58,85	27,43	10,38
	101,93	88,58	25,75	8,52
	95,84	85,80	51,76	22,20
Mittelwert	93,74	77,74	34,98	13,70
SD	9,42	16,42	14,56	7,42
<i>mhfl-2</i>	81,22	77,06	21,05	10,79
	99,01	89,72	42,80	15,95
	103,72	96,19	23,38	15,85
Mittelwert	94,65	87,66	29,08	14,20
SD	11,87	9,73	11,94	2,96

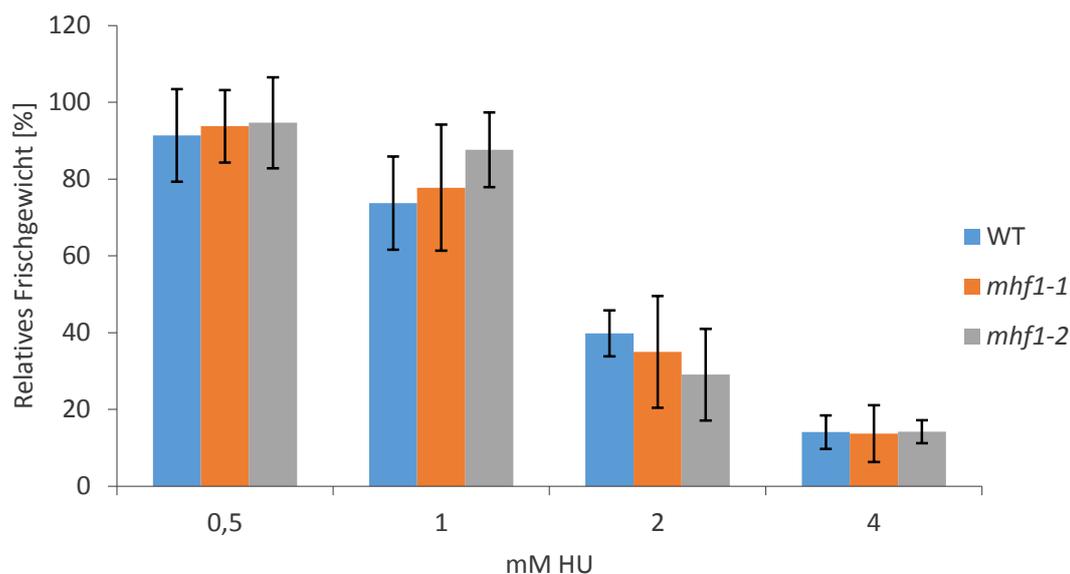


Abbildung 8.4: Sensitivität von *mhfl-1* und *mhfl-2* gegenüber Hydroxyurea.

Die Einzelmutanten *mhfl-1*, *mhfl-2*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 0,5, 1, 2 und 4 mM Hydroxyurea (HU) behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabelle 8.11: Sensitivität von *mhfl-1* und *mhfl-2* gegenüber Camptothecin.

Die Linien *mhfl-1*, *mhfl-2*, sowie der Wildtyp wurden mit 150 und 300 nM Camptothecin (CPT) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.5 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei	
	150	300 nM CPT
WT	62,4	50,0
	61,03	38,09
	79,77	57,19
	70,05	63,36
	63,11	63,02
	65,57	57,92
Mittelwert	66,98	54,93
SD	7,02	9,57
<i>mhfl-1</i>	73,68	42,01
	70,59	67,70
	66,93	59,72
	68,69	56,20
	58,07	65,37
	59,87	55,17
Mittelwert	66,31	57,69
SD	6,13	9,14
<i>mhfl-2</i>	64,21	60,34
	66,67	48,35
	61,95	54,08
	66,14	62,21
	55,75	63,00
	58,27	58,57
Mittelwert	62,16	57,76
SD	4,40	5,60

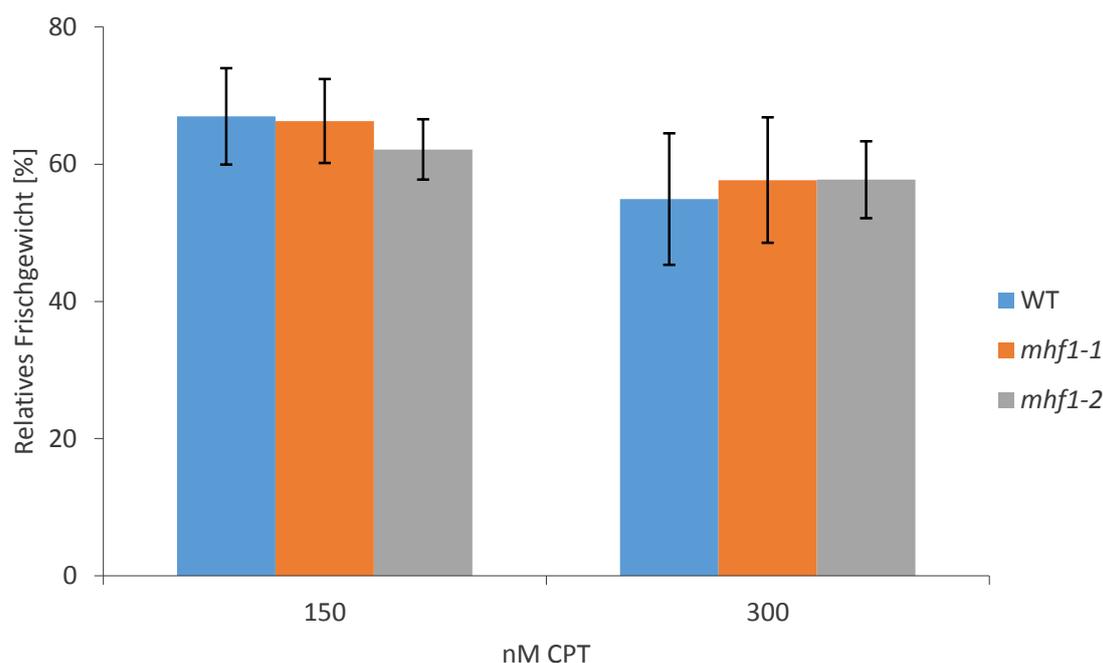


Abbildung 8.5: Sensitivität von *mhfl-1* und *mhfl-2* gegenüber Camptothecin.

Die Einzelmutanten *mhfl-1*, *mhfl-2*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 150 und 300 nM Camptothecin (CPT) behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabelle 8.12: Sensitivität der Doppelmutante *mhfl-1 recq4A-4* gegenüber Mitomycin C.

Die Linien *mhfl-1*, *recq4A-4*, *mhfl-1 recq4A-4*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	110,96	89,67	48,24	22,29
	84,63	61,66	53,80	38,69
	74,56	59,74	41,22	27,86
	117,08	80,34	58,35	43,37
	78,41	59,11	63,87	32,45
	79,59	51,28	28,80	18,24
Mittelwert	90,87	66,97	49,05	30,48
SD	18,32	14,71	12,66	9,60
<i>mhfl-1</i>	100,00	27,47	27,47	21,16
	81,55	58,12	38,67	38,23
	79,86	69,96	65,50	43,31
	68,61	68,70	50,58	35,25
	85,51	51,02	49,49	31,43
	81,41	60,55	43,67	29,86
Mittelwert	82,82	55,97	45,90	33,20
SD	10,17	15,62	12,77	7,63

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
<i>recq4A-4</i>	59,72	60,65	38,47	20,84
	68,81	44,49	34,55	27,64
	58,32		33,48	15,62
	60,67	47,34	38,09	19,39
	85,27	60,89	59,03	42,29
Mittelwert	66,56	53,34	40,72	25,16
SD	11,23	8,66	10,46	10,52
<i>mhf1-1 recq4A-4</i>	76,9	34,2	41,6	13,3
	84,67	34,48	23,13	33,74
	52,50	36,33	21,67	17,83
	73,11	48,05	26,65	29,28
	41,68	27,35	18,93	11,71
Mittelwert	65,77	33,09	26,40	21,16
SD	17,96	3,94	8,95	9,84
T-Test gegen <i>mhf1-1</i>	0,1909	0,0036	0,0025	0,0853
T-Test gegen <i>recq4A-4</i>	0,9362	0,0196	0,0491	0,5527

Tabelle 8.13: Sensitivität der Doppelmutante *mhf1-1 mus81-1* gegenüber Mitomycin C.

Die Linien *mhf1-1*, *mus81-1*, *mhf1-1 mus81-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	82,21	60,82	31,53	32,10
	93,89	62,46	50,57	26,79
	80,33	59,32	49,74	24,72
	60,21	67,94	46,71	50,53
	Mittelwert	79,16	62,63	44,64
SD	13,98	3,76	8,89	11,75
<i>mhf1-1</i>	59,85	49,80	22,54	24,38
	91,54	58,74	47,78	36,58
	67,35	66,17	25,31	16,94
	94,77	41,92	62,15	35,72
	Mittelwert	78,38	54,16	39,45
SD	17,39	10,55	18,89	9,45
<i>mus81-1</i>	39,20	26,78	20,22	15,70
	39,71	21,22	19,95	15,12
	45,23	30,20	22,88	16,34
	72,64	38,95	34,37	25,20
	Mittelwert	49,19	29,29	24,35
SD	15,87	7,43	6,81	4,77
<i>mhf1-1 mus81-1</i>	28,6	13,6	9,2	14,2
	38,13	20,82	16,90	13,08
	63,40	12,85	17,38	10,77
	36,01	32,75	21,96	20,95
	Mittelwert	41,52	20,02	16,37
SD	15,15	9,21	5,28	4,38
T-Test gegen <i>mhf1-1</i>	0,01918	0,00292	0,08828	0,05530
T-Test gegen <i>mus81-1</i>	0,5106	0,1705	0,1162	0,3405

Tabelle 8.14: Sensitivität der Doppelmutante *mhf1-1 rad5A-2* gegenüber Mitomycin C.

Die Linien *mhf1-1*, *rad5A-2*, *mhf1-1 rad5A-2*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	105,2	81,6	74,1	71,1
	100,6	75,9	65,4	53,6
	97,4	86,9	77,5	67,9
Mittelwert	101,08	81,48	72,34	50,00
SD	3,95	5,49	6,22	9,31
<i>mhf1-1</i>	90,64	88,28	78,02	74,64
	110,85	94,70	72,78	62,09
	98,3	86,9	78,7	65,0
Mittelwert	99,94	89,97	76,51	44,00
SD	10,21	4,15	3,24	6,57
<i>rad5A-2</i>	46,23	34,95	24,06	15,88
	24,02	21,94	12,99	11,68
	22,32	17,63	15,38	13,97
Mittelwert	30,85	24,84	17,48	13,84
SD	13,34	9,02	5,83	2,10
<i>mhf1-1 rad5A-2</i>	44,19	16,18	16,50	19,98
	36,44	21,12	15,32	11,51
	33,60	24,66	13,90	15,06
Mittelwert	38,07	20,65	15,24	15,52
SD	5,48	4,26	1,30	4,25
T-Test gegen <i>mhf1-1</i>	0,0024	0,0000	0,0002	0,0008
T-Test gegen <i>rad5A-2</i>	0,4572	0,5222	0,5776	0,5853

Tabelle 8.15: Sensitivität der Doppelmutante *mhf1-1 fancm-1* gegenüber Mitomycin C.

Die Linien *mhf1-1*, *fancm-1*, *mhf1-1 fancm-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	81,37	60,67	45,29	36,50
	89,90	64,60	61,24	54,18
	77,29	72,62	69,61	53,08
	100,90	58,66	65,70	57,67
	109,69	68,43	64,34	25,17
	97,14	67,10	69,36	64,38
Mittelwert	92,72	65,35	62,59	48,50
SD	12,24	5,15	9,04	14,68
<i>mhf1-1</i>	69,15	50,82	24,19	26,54
	74,99	35,70	37,85	54,32
	100,09	65,92	36,84	21,94
	97,99	84,63	66,96	40,06
	79,51	77,57	55,53	49,71
	79,37	64,18	59,69	44,79
Mittelwert	83,52	64,81	48,51	39,56
SD	12,62	14,96	13,93	12,87

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
<i>mhf1-2</i>	70,8	57,1	50,2	35,6
	77,33	54,26	61,95	25,13
	60,97	33,02	47,38	27,24
	76,94	56,88	60,96	51,85
	77,57	65,91	52,00	43,91
Mittelwert	72,72	53,44	54,49	36,75
SD	7,15	12,23	6,58	11,25

Tabelle 8.16: Sensitivität der Doppelmutante *mhf1-1 fancjb-1* gegenüber Mitomycin C.

Die Linien *mhf1-1*, *fancm-1*, *mhf1-1 fancm-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	91,56	83,61	79,05	41,51
	82,30	50,67	40,77	31,09
	75,17	41,48	42,74	17,17
	106,30	71,27	51,22	51,85
Mittelwert	88,83	61,76	53,44	35,41
SD	13,44	19,17	17,66	14,82
<i>mhf1-1</i>	97,34	70,02	48,81	52,11
	73,37	56,69	57,68	25,99
	74,62	40,02	38,31	31,76
Mittelwert	81,77	55,58	48,27	36,62
SD	13,49	15,03	9,70	13,72
<i>fancjb-1</i>	58,96	44,75	31,28	31,77
	34,17	20,00	15,23	12,58
	32,68	20,25	16,94	10,73
Mittelwert	41,94	28,33	21,15	18,36
SD	14,76	14,22	8,81	11,65
<i>mhf1-1 fancjb-1</i>	56,77	43,14	32,80	20,76
	40,04	19,23	20,80	9,91
	31,85	24,48	20,48	10,34
Mittelwert	42,89	28,95	24,69	13,67
SD	12,70	12,57	7,02	6,14
T-Test gegen <i>mhf1-1</i>	0,0222	0,0802	0,0312	0,0841
T-Test gegen <i>fancjb-1</i>	0,9369	0,9579	0,6161	0,5807

Tabelle 8.17: Relative Rekombinationsrate von *mhf1-1* und *mhf1-2*.

Die Tabelle zeigt die spontane relative homologe Rekombinationsrate (HR-Rate) [%] der beiden Einzelmutanten *mhf1-1* und *mhf1-2*, sowie des Wildtyps (WT). Das Ergebnis ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

Linie	Spontane relative HR-Rate [%]
WT	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
Mittelwert	100,00
SD	0
<i>mhf1-1</i>	26,63
	27,72
	47,20
	37,04
	11,99
	64,10
	75,71
	16,07
	16,40
Mittelwert	35,87
SD	22,38
T-Test gegen WT	0,0001
<i>mhf1-2</i>	46,94
	17,81
	12,79
	67,14
Mittelwert	36,17
SD	25,55
T-Test gegen WT	0,015

Tabelle 8.18: Relative Rekombinationsrate der *mhf1-1 recq4A-4* Doppelmutante.

Die Tabelle zeigt die spontane relative homologe Rekombinationsrate (HR-Rate) [%] der beiden Einzelmutanten *mhf1-1*, *recq4A-4*, der Doppelmutante *mhf1-1 recq4A-4*, sowie des Wildtyps (WT) (vgl. Abbildung 3.11)

Linie	Spontane relative HR-Rate [%]
WT	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
Mittelwert	100,00
SD	0
<i>mhf1-1</i>	26,63
	27,72
	47,20
	37,04
	11,99
	64,10
	75,71
	16,07
	16,40
Mittelwert	35,87
SD	22,38
T-Test gegen WT	0,0001
<i>recq4A-4</i>	428,67
	340,74
	476,47
	680,00
	643,70
Mittelwert	513,92
SD	144,12
T-Test gegen WT	0,0030
<i>mhf1-1 recq4A-4</i>	541,31
	286,59
	245,81
	641,03
	1133,33
	811,76
	365,56
Mittelwert	575,06
SD	221,39
T-Test gegen <i>recq4A-4</i>	0,67

Tabelle 8.19: Relative Rekombinationsrate der *mhf1-1 mus81-1* Doppelmutante.

Die Tabelle zeigt die spontane relative homologe Rekombinationsrate (HR-Rate) [%] der beiden Einzelmutanten *mhf1-1*, *mus81-1*, der Doppelmutante *mhf1-1 mus81-1*, sowie des Wildtyps (WT) (vgl. Abbildung 3.12).

Linie	Spontane relative HR-Rate[%]
WT	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
Mittelwert	100,00
SD	0
<i>mhf1-1</i>	26,63
	27,72
	47,20
	37,04
	11,99
	64,10
	75,71
	16,07
	16,40
Mittelwert	35,87
SD	22,38
T-Test gegen WT	0,0001
<i>mus81-1</i>	31,45
	27,83
	52,22
Mittelwert	37,17
SD	13,16
T-Test gegen WT	0,0030
<i>mhf1-1 mus81-1</i>	23,96
	20,56
	46,67
	76,51
Mittelwert	41,92
SD	14,20
T-Test gegen WT	0,020

Tabelle 8.20: Relative Rekombinationsrate der *mhf1-1 fancm-1* Doppelmutante.

Die Tabelle zeigt die spontane relative homologe Rekombinationsrate (HR-Rate) [%] der beiden Einzelmutanten *mhf1-1*, *fancm-1*, der Doppelmutante *mhf1-1 fancm-1*, sowie des Wildtyps (WT) (vgl. Abbildung 3.13).

Linie	Spontane relative HR-Rate[%]
WT	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
Mittelwert	100,00
SD	0,000
<i>mhf1-1</i>	26,63
	27,72
	47,20
	37,04
	11,99
	64,10
	75,71
	16,07
	16,40
Mittelwert	35,87
SD	22,38
T-Test gegen WT	0,0001
<i>fancm-1</i>	275,32
	180,20
	222,30
	168,40
	141,00
Mittelwert	198,84
SD	52,46
T-Test gegen WT	0,014
<i>mhf1-1 fancm-1</i>	41,90
	108,16
	67,65
	23,69
	4,11
	19,26
	67,65
	Mittelwert
SD	14,20
T-Test gegen WT	0,02

Tabelle 8.21: Anzahl der Samen und Länge pro Schote von *mhf1-1*, *mhf1-2* und dem Wildtyp.

In der Tabelle sind die Mittelwerte der Anzahl Samen und Länge pro Schote von fünf getesteten Pflanzen einer Linie aufgelistet. Der Mittelwert von den jeweils fünf getesteten Linien und die Standardabweichung sind ebenfalls angegeben.

Linie	Mittelwert Anzahl Samen pro Schote einer Pflanze	Mittelwert Länge pro Schote einer Pflanze [cm]
WT	42,6	1,26
	43,2	1,26
	41,67	1,13
	44,4	1,18
	46,2	1,22
Mittelwert	43,6	1,2
SD	1,75	0,05
<i>mhf1-1</i>	42	1,2
	50	1,25
	45,20	1,10
	42,25	1,25
	44,25	1,15
Mittelwert	44,7	1,2
SD	3,23	0,07
<i>mhf1-2</i>	45	1,3
	35,5	1,15
	49,00	1,30
	46,8	1,26
	47	1,2
Mittelwert	44,1	1,3
SD	5,31	0,07

Tabelle 8.22: Relative Expression von *AtFAN1*.

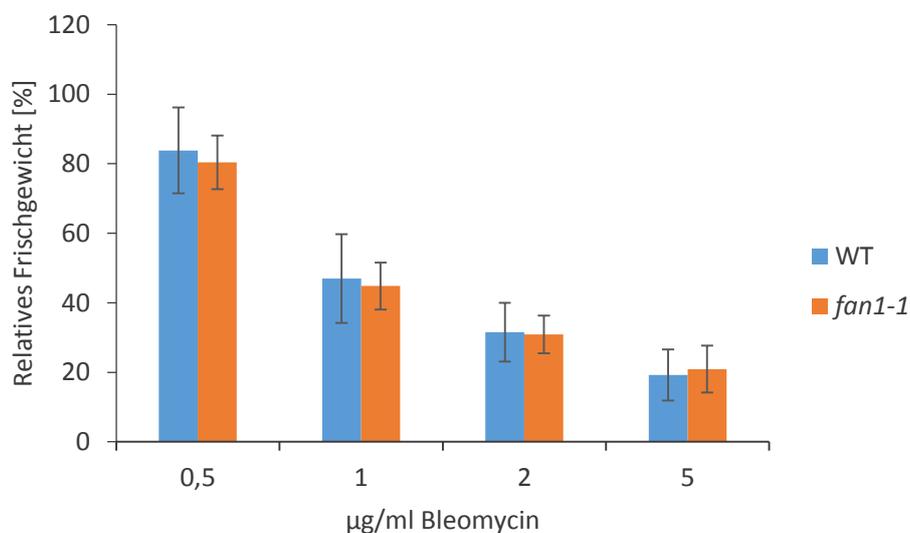
In der Tabelle sind die Werte der relativen Expression von *FAN1* in der Mutantenlinie *fan1-1* dargestellt. Zur Normalisierung diente das Haushaltsgen *ACTIN2*. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

Versuch Nr.	5' der T-DNA		Über die T-DNA		3' der T-DNA	
	WT	<i>fan1-1</i>	WT	<i>fan1-1</i>	WT	<i>fan1-1</i>
1	1	0,8975	1	0,0255	1	0,0915
2	1	0,9962	1	0,0000	1	0,1047
3	1	0,9846	1	0,0319	1	0,0968

Tabelle 8.23: Sensitivität von *fan1-1* gegenüber Bleomycin.

Die Linie *fan1-1*, sowie der Wildtyp wurden mit 0,5, 1, 2 und 5 µg/ml Bleomycin (Bleo) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.6 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	0,5	1	2	5 µg/ml Bleo
WT	76,46	37,64	20,59	15,61
	102,04	51,72	43,13	30,90
	87,40	47,87	30,43	14,34
	69,34	32,54	27,80	22,00
	83,9	65,2	35,6	13,3
Mittelwert	83,83	46,98	31,52	19,22
SD	12,34	12,74	8,46	7,36
<i>fan1-1</i>	83,68	50,96	39,91	28,42
	87,42	52,52	31,39	23,44
	71,38	43,02	28,36	13,61
	72,83	36,54	25,99	25,06
	86,72	41,03	28,71	13,97
Mittelwert	80,41	44,81	30,87	20,90
SD	7,73	6,77	5,40	6,74

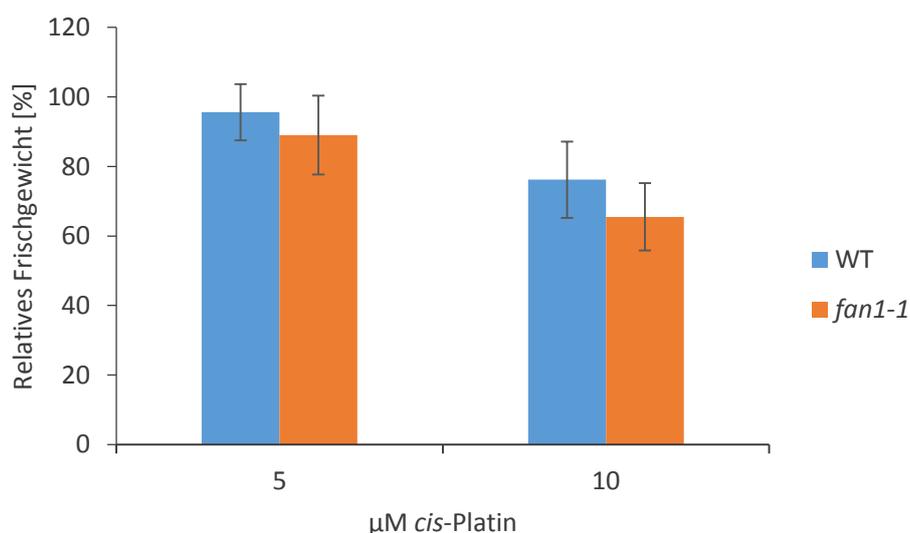
**Abbildung 8.6: Sensitivität von *fan1-1* gegenüber Bleomycin.**

Die Einzelmutante *fan1-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 0,5, 1, 2 und 5 µg/ml Bleomycin behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabelle 8.24: Sensitivität von *fan1-1* Mutante gegenüber *cis*-Platin.

Die Linie *fan1-1*, sowie der Wildtyp wurden mit 5 und 10 μM *cis*-Platin behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.7 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei	
	5	10 μM <i>cis</i> -Platin
WT	86,70	70,60
	91,39	69,39
	97,12	65,78
	91,35	68,02
	90,46	75,63
	94,05	77,91
	96,27	75,16
	89,98	68,25
	106,18	94,38
	112,88	97,03
Mittelwert	95,64	76,21
SD	8,09	10,98
<i>fan1-1</i>	93,07	66,57
	88,8	66,0
	73,30	67,72
	72,44	49,89
	89,08	64,09
	85,94	57,22
	89,63	59,34
	86,03	64,71
	109,09	73,41
	102,93	86,02
Mittelwert	89,03	65,50
SD	11,32	9,68

**Abbildung 8.7: Sensitivität von *fan1-1* gegenüber *cis*-Platin.**

Die Einzelmutante *fan1-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 5 und 10 μM *cis*-Platin behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabelle 8.25: Sensitivität von *fan1-1* gegenüber Mitomycin C.

Die Linie *fan1-1*, sowie der Wildtyp wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	90,57	75,15	55,36	39,85
	86,36	91,47	70,82	67,03
	88,85	71,45	52,89	43,06
	98,75	98,30	59,07	66,55
	83,06	69,93	63,76	54,36
Mittelwert	89,52	81,26	60,38	49,14
SD	5,89	12,81	7,13	13,49
<i>fan1-1</i>	78,77	46,73	28,15	12,61
	64,10	56,17	43,05	31,42
	83,23	41,90	25,36	19,97
	66,12	39,61	34,92	15,93
	51,14	51,34	18,50	21,17
	80,96	38,47	15,54	10,33
Mittelwert	70,72	45,70	27,59	18,57
SD	12,45	7,02	10,25	7,54
T-Test gegen WT	0,0124	0,0015	0,0002	0,0013

Tabelle 8.26: Sensitivität von *fan1-1* gegenüber Methylmethansulfonat.

Die Linie *fan1-1*, sowie der Wildtyp wurden mit 20, 40, 60 und 100 ppm Methylmethansulfonat (MMS) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.8 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	20	40	60	100 ppm MMS
WT	68,12	50,38	50,08	5,47
	105,52	68,95	31,18	12,25
	79,61	71,50	48,17	6,14
	91,03	75,56	58,17	15,57
	89,69	92,21	50,88	5,49
	94,46	87,33	73,95	33,97
Mittelwert	88,07	74,32	52,07	13,15
SD	12,86	14,84	13,95	11,01
<i>fan1-1</i>	56,61	43,72	31,58	5,16
	93,57	58,28	46,70	9,50
	87,68	70,51	53,64	6,06
	91,32	80,93	47,61	16,20
	87,53	81,71	68,82	11,17
Mittelwert	83,34	67,03	49,67	9,62
SD	15,16	16,13	13,44	4,43

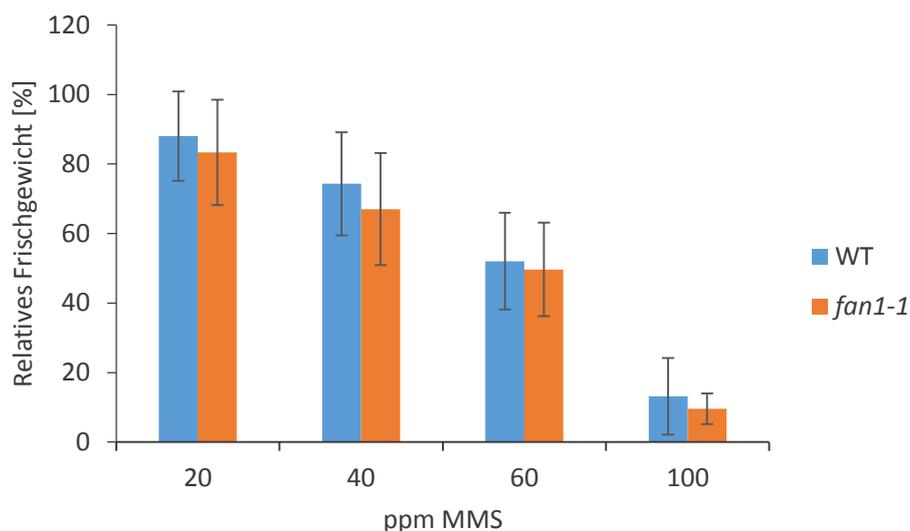


Abbildung 8.8: Sensitivität von *fan1-1* gegenüber Methylmethansulfonat.

Die Einzelmutante *fan1-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 20, 40, 60 und 100 ppm Methylmethansulfonat (MMS) behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabelle 8.27: Sensitivität von *fan1-1* gegenüber Hydroxyurea

Die Linie *fan1-1*, sowie der Wildtyp wurden mit 0,5, 1, 2 und 4 mM Hydroxyurea (HU) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.9 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	0,5	1	1	4 mM HU
WT	77,47	59,88	32,99	14,53
	97,4	82,5	42,5	18,2
	99,2	78,9	44,0	9,5
Mittelwert	91,35	73,75	39,83	14,08
SD	12,05	12,14	5,96	4,34
<i>fan1-1</i>	85,2	64,8	41,5	14,4
	95,72	88,96	26,80	16,01
	97,81	77,69	45,28	16,91
Mittelwert	92,92	77,16	37,84	15,79
SD	6,75	12,08	9,76	1,24

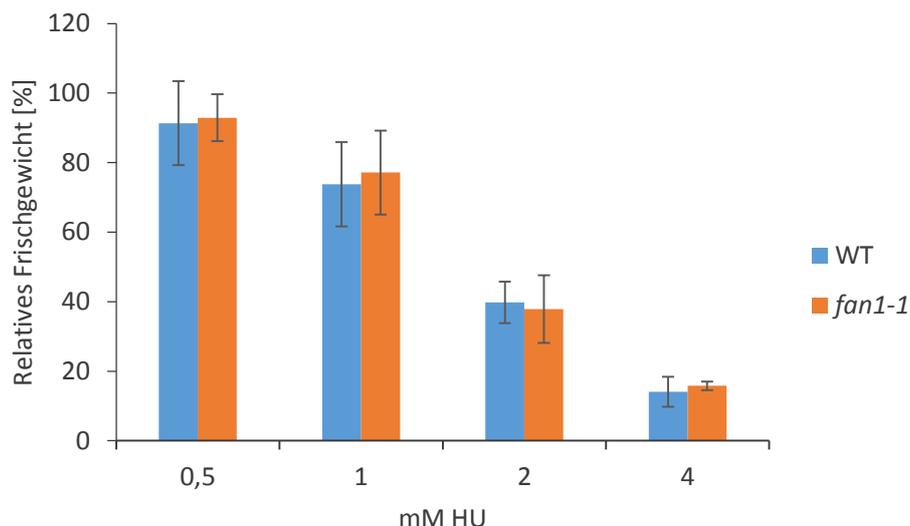


Abbildung 8.9: Sensitivität von *fan1-1* gegenüber Hydroxyurea.

Die Einzelmutante *fan1-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 0,5, 1, 2 und 4 mM Hydroxyurea (HU) behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabelle 8.28: Sensitivität von *fan1-1* gegenüber Camptothecin.

Die Linie *fan1-1*, sowie der Wildtyp wurden mit 150 und 300 nM Camptothecin (CPT) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.10 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei	
	150	300 nM CPT
WT	62,4	50,0
	61,03	38,09
	79,77	57,19
	70,05	63,36
	63,11	63,02
	65,57	57,92
Mittelwert	66,98	54,93
SD	7,02	9,57
<i>fan1-1</i>	70,61	60,05
	72,08	45,28
	57,27	63,16
	52,04	47,72
	51,65	56,06
Mittelwert	60,73	54,45
SD	9,95	7,73

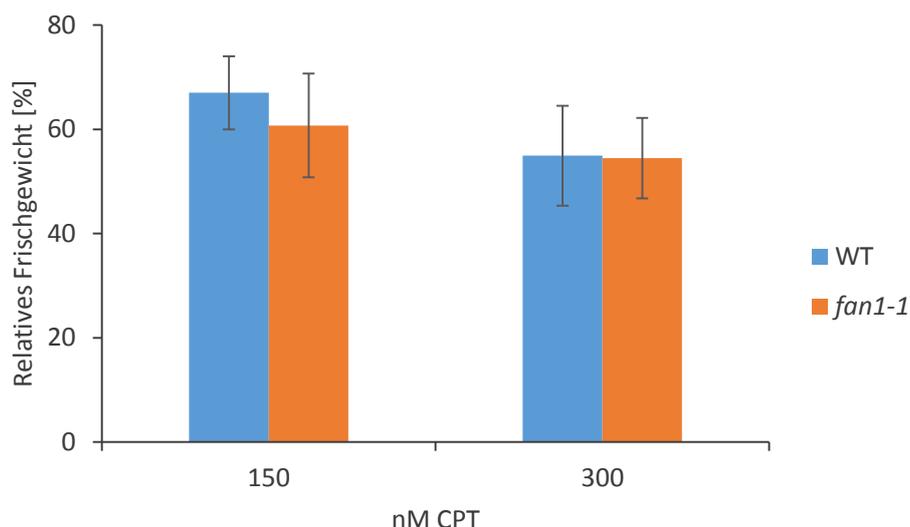


Abbildung 8.10: Sensitivität von *fan1-1* gegenüber Camptothecin.

Die Einzelmutante *fan1-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit jeweils 150 und 300 nM Camptothecin (CPT) behandelt und das Frischgewicht nach zwei Wochen Inkubation bestimmt. Das relative Frischgewicht wurde anhand der unbehandelten Kontrolle einer jeden Linie berechnet. Die Säulen des Diagramms geben dabei die Mittelwerte der getesteten Linien an. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Pro Linie wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Tabelle 8.29: Sensitivität der *fan1-1*::FAN1 WT Linien.

Die Linie *fan1-1*, der Wildtyp und die vier genetisch unterschiedlichen *fan1-1*::FAN1 WT Linien ND572, ND573, ND574, ND589 wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	102,1	77,3	51,4	44,5
	97,5	79,4	56,4	57,1
	92,0	74,3	63,7	74,8
	93,31	81,10	58,41	46,47
	90,22	83,75	59,67	50,91
	95,93	76,93	63,65	57,76
	102,00	84,26	60,24	65,24
	Mittelwert	96,16	79,58	59,07
SD	4,68	3,69	4,31	10,71
<i>fan1-1</i>	74,17	34,48	27,16	17,10
	78,12	37,40	24,30	18,22
	84,0	56,5	33,9	29,1
	72,63	52,39	23,36	11,53
	85,13	41,10	32,55	29,51
	71,74	51,62	30,97	23,18
	64,89	28,66	25,31	14,28
	Mittelwert	75,81	43,16	28,22
SD	7,16	10,46	4,22	7,05
T-Test gegen WT	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
ND572	89,51	85,85	50,87	60,87
	94,82	81,53	66,75	60,10
	107,71	92,96	70,05	63,14
	96,83	86,19	63,25	57,65
Mittelwert	97,22	86,64	62,73	60,44
SD	7,64	4,72	8,38	2,26
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,0038	0,0000	0,0017	0,0000
ND573	92,50	74,38	58,04	49,02
	104,32	92,69	77,33	71,03
	98,22	80,44	84,24	72,78
	93,87	80,43	66,82	59,42
Mittelwert	97,23	81,98	71,61	63,06
SD	5,32	7,69	11,54	11,08
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,0005	0,0001	0,0033	0,0015
ND574	97,98	78,77	57,78	47,82
	95,48	90,63	70,71	59,33
	93,27	87,67	72,47	61,36
	90,25	80,46	67,31	59,72
Mittelwert	94,25	84,38	67,06	57,06
SD	3,28	5,68	6,55	6,22
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,0003	0,0000	0,0002	0,0000
ND589	97,98	78,77	57,78	47,82
	95,48	90,63	70,71	59,33
	93,27	87,67	72,47	61,36
	90,25	80,46	67,31	59,72
Mittelwert	94,25	84,38	67,06	57,06
SD	3,28	5,68	6,55	6,22
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,0023	0,0168	0,0002	0,0000

Tabelle 8.30: Relative Expression von *FAN1* in den *fan1-1*::*FAN1* WT Linien.

In der Tabelle sind die Werte der relativen Expression von *FAN1* in den *fan1-1*::*FAN1* WT Linien dargestellt. Zur Normalisierung diente das Haushaltsgen *ACTIN2*. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.11 dargestellt.

	relative Expression
WT	1
	1
	1
	1
Mittelwert	1
SD	0
<i>fan1-1</i>	0,091
	0,0763
	0,2016
	0,043

	relative Expression
Mittelwert	0,10
SD	0,0687
ND572	1,108
	4,109
	3,928
	0,9525
Mittelwert	2,5244
SD	1,7792
ND573	1,611
	4,924
	5,309
	1,899
Mittelwert	3,4358
SD	1,8353
ND574	2,937
	3,229
	5,185
	1,547
Mittelwert	3,2245
SD	0,8987
ND589	3,048
	3,616
	3,389
	2,728
Mittelwert	3,1953
SD	0,3893

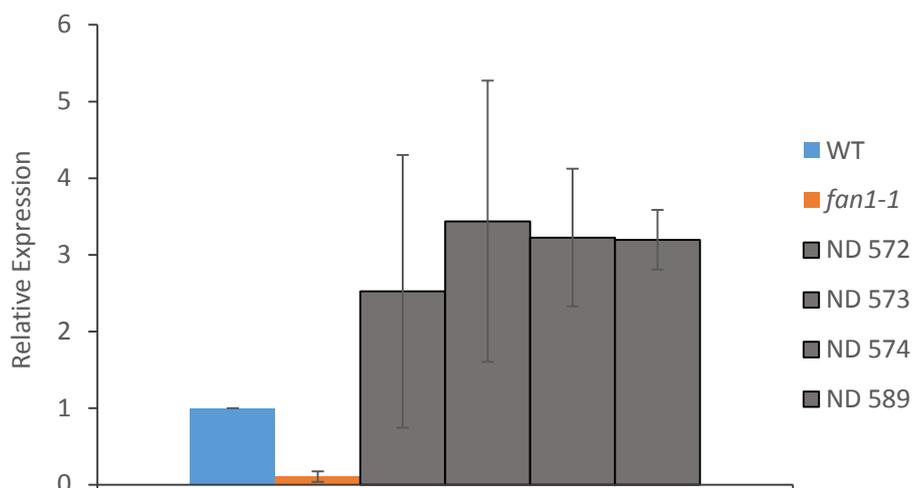


Abbildung 8.11: Relative Expression von *FAN1* in den *fan1-1*::*FAN1* WT Linien.

Die Abbildung zeigt die relative Expression von *FAN1* in den *fan1-1*::*FAN1* WT Linien, in der *fan1-1* Mutante und im WT.

Tabelle 8.31: Sensitivität der *fan1-1*::*FAN1* NUC1 Linien.

Die Linie *fan1-1*, der Wildtyp und die vier genetisch unterschiedlichen *fan1-1*::*FAN1* NUC1 Linien ND690, ND692, ND760, ND761 wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.23 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	91,56	83,61	69,05	41,51
	82,30	50,67	40,77	31,09
	75,17	61,48	42,74	17,17
	87,62	85,82	58,75	46,03
	80,74	72,09	67,89	69,69
	86,62	61,09	53,70	49,02
	94,39	79,54	64,70	51,88
	Mittelwert	85,49	70,62	56,80
SD	6,60	13,25	11,57	16,55
<i>fan1-1</i>	44,02	22,54	10,68	8,23
	47,06	17,56	6,02	9,80
	69,79	25,62	43,50	36,52
	68,57	47,33	17,24	18,19
	62,26	17,40	34,44	16,49
	51,57	46,10	21,14	21,05
	44,02	22,54	10,68	8,23
	Mittelwert	57,21	29,43	22,17
SD	11,15	13,76	14,31	10,16
T-Test gegen WT	0,0006	0,0002	0,0009	0,0069

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
ND690	66,81	27,14	35,77	19,12
	62,69	56,20	19,15	16,95
	64,42	50,69	23,66	28,72
	65,81	52,58	29,60	15,79
	72,14	41,91	24,72	22,35
Mittelwert	66,38	45,71	26,58	20,59
SD	3,58	11,63	6,34	5,19
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,1048	0,0624	0,5182	0,6552
ND692	42,27	53,17	47,54	17,69
	67,97	57,80	28,22	19,78
	62,00	35,70	17,35	15,00
	83,19	50,28	39,94	20,05
	67,70	24,78	22,92	14,16
Mittelwert	64,63	44,35	31,19	17,34
SD	14,76	13,71	12,38	2,69
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,3845	0,1077	0,2912	0,8174
ND760	70,71	56,89	30,84	14,62
	64,30	53,31	16,00	10,42
	57,61	20,69	15,12	11,32
Mittelwert	64,21	43,63	20,65	12,12
SD	6,55	19,95	8,83	2,21
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,2787	0,3487	0,8512	0,2004
ND761	61,94	29,53	39,91	33,86
	65,62	48,65	19,32	12,56
	39,81	16,80	14,42	11,84
Mittelwert	55,79	31,66	24,55	19,42
SD	13,96	16,03	13,53	12,51
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,8868	0,8479	0,8183	0,9079

Tabelle 8.32: Relative Expression von *FAN1-1* in den *fan1-1::FAN1* NUC1 Linien.

In der Tabelle sind die Werte der relativen Expression von *FAN1* in den *fan1-1::FAN1* NUC1 Linien dargestellt. Zur Normalisierung diente das Haushaltsgen *ACTIN2*. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.12 dargestellt.

	relative Expression
WT	1
	1
	1
Mittelwert	1
SD	0
<i>fan1-1</i>	0,0384
	0,0292
	0,1281

	relative Expression
Mittelwert	0,03
SD	0,0065
ND690	19,42
	22,79
	24,15
Mittelwert	22,12
SD	2,4351
ND692	70,17
	79,14
	61,84
Mittelwert	70,38
SD	8,652
ND760	81,78
	63,11
	45,07
Mittelwert	63,33
SD	60,51
ND761	69,17
	69,08
	43,28
Mittelwert	18,3559
SD	14,9217

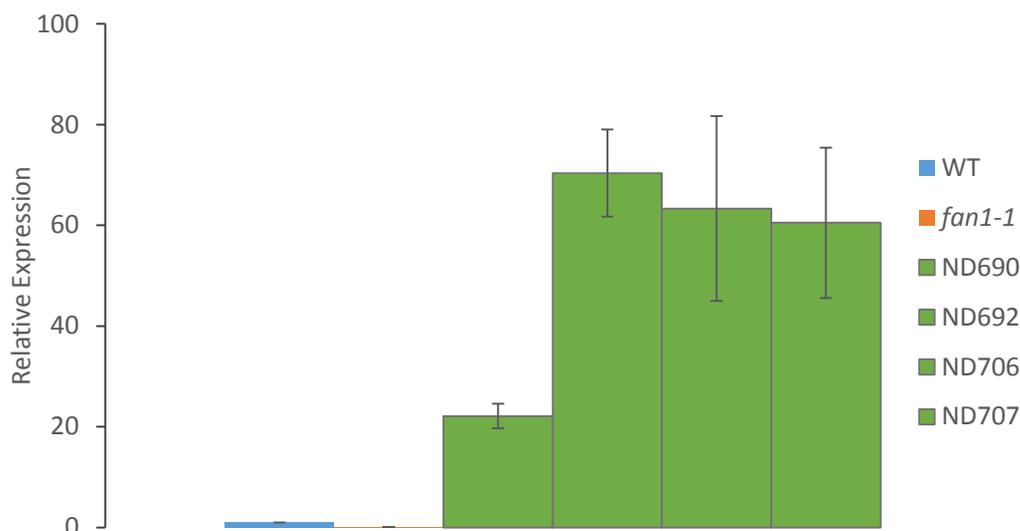


Abbildung 8.12: Relative Expression von *FAN1* in den *fan1-1::FAN1* NUC1 Linien.

Die Abbildung zeigt die relative Expression von *FAN1* in den *fan1-1::FAN1* NUC1 Linien, in der *fan1-1* Mutante und im WT.

Tabelle 8.33: Sensitivität der *fan1-1::NUC2* Linien.

Die Linie *fan1-1*, der Wildtyp und die vier genetisch unterschiedlichen *fan1-1::FAN1* NUC2 Linien ND684, ND687, ND688, ND697 wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.23 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	90,60	68,39	46,63	33,93
	73,32	60,85	64,47	53,82
	94,19	56,13	37,35	32,51
	94,39	79,54	64,70	51,88
	103,18	78,41	46,73	40,65
Mittelwert	91,14	68,67	51,98	42,56
SD	10,99	10,39	12,12	9,91
<i>fan1-1</i>	53,59	34,90	18,42	13,08
	77,14	34,03	31,99	9,64
	54,38	25,15	15,07	9,47
	51,57	46,10	21,14	21,05
	Mittelwert	59,17	35,05	21,65
SD	12,04	8,59	7,32	5,42
T-Test gegen WT	0,0057	0,0011	0,0027	0,0011
ND684	76,02	43,32	23,56	23,32
	74,41	58,18	33,66	28,01
	78,67	50,62	36,99	25,31
	89,35	62,78	33,59	23,37
	78,97	58,43	43,21	21,03
Mittelwert	79,48	54,67	34,20	24,21
SD	5,83	7,71	7,12	2,61
T-Test gegen WT	0,0803	0,0443	0,0277	0,0124
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,0350	0,0112	0,0387	0,0199

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
ND687	60,12	45,41	36,85	23,27
	63,72	37,27	38,87	19,51
	72,29	52,61	42,89	26,81
Mittelwert	65,38	45,10	39,54	23,20
SD	6,25	7,67	3,07	3,65
T-Test gegen WT	0,0504	0,0859	0,0718	00051
T-Test gegen <i>fanI-1</i>	0,2190	0,1027	0,2312	0,1223
ND688	72,06	40,30	32,67	18,99
	74,02	54,33	27,68	38,42
	77,97	60,04	28,62	19,42
	81,44	62,64	52,08	33,92
Mittelwert	76,37	54,33	35,26	27,69
SD	4,18	9,98	11,42	9,97
T-Test gegen WT	0,0368	0,0753	0,0729	0,0635
T-Test gegen <i>fanI-1</i>	0,0586	0,0270	0,0998	0,0560
ND697	75,35	46,46	37,08	21,59
	60,44	56,03	23,01	26,64
	69,91	45,71	39,31	22,44
	67,82	57,31	41,49	23,63
	84,85	56,07	47,58	29,58
Mittelwert	71,68	52,32	37,69	24,78
SD	9,10	5,72	9,09	3,30
T-Test gegen WT	0,0165	0,0201	0,0708	0,0131
T-Test gegen <i>fanI-1</i>	0,1405	0,0179	0,0220	0,0152

Tabelle 8.34: Relative Expression von *FAN1* in den *fanI-1*::*FAN1* NUC2 Linien.

In der Tabelle sind die Werte der relativen Expression von *FAN1* in den *fanI-1*::*FAN1* NUC2 Linien dargestellt. Zur Normalisierung diente das Haushaltsgen *ACTIN2*. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.13 dargestellt.

	relative Expression
WT	1
	1
	1
Mittelwert	1
SD	0
<i>fanI-1</i>	0,0384
	0,0292
	0,1281
Mittelwert	0,03
SD	0,0065
ND684	5,996
	5,477
	4,139

relative Expression	
Mittelwert	5,204
SD	0,9581
	9,208
ND687	5,254
	4,08
Mittelwert	6,18
SD	2,6867
	36,15
ND688	29,59
	27,71
Mittelwert	31,15
SD	4,4310
	73,17
ND697	153,4
	173,8
Mittelwert	133,46
SD	53,1968

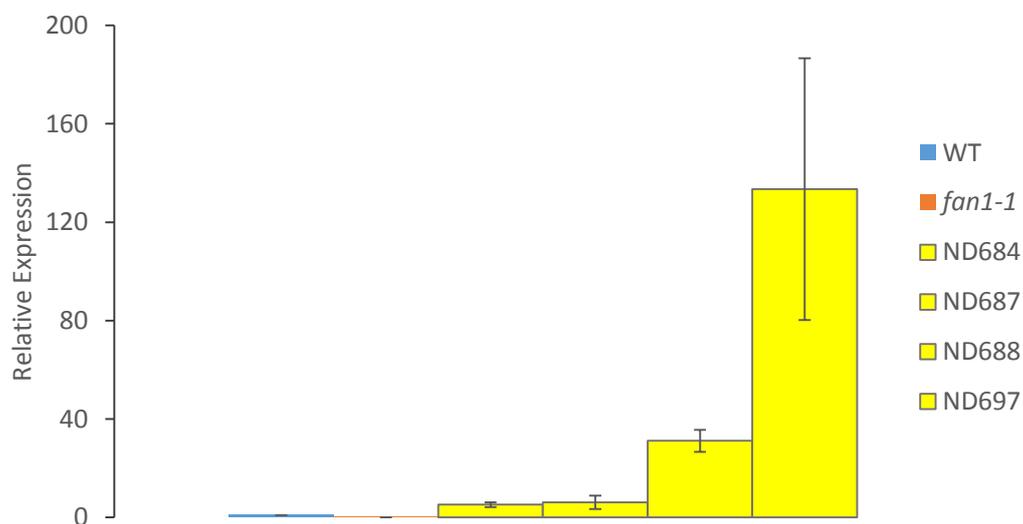


Abbildung 8.13: Relative Expression von *FAN1* in den *fan1-1::FAN1* NUC2 Linien.

Die Abbildung zeigt die relative Expression von *FAN1* in den *fan1-1::FAN1* NUC2 Linien, in der *fan1-1* Mutante und im WT.

Tabelle 8.35: Sensitivität der *fan1-1*::FAN1 Del UBZ Linien.

Die Linie *fan1-1*, der Wildtyp und die vier genetisch unterschiedlichen *fan1-1*::FAN1 Del UBZ Linien ND766, ND767, ND768, ND769 wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.25 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	91,12	78,20	63,36	38,69
	92,99	95,35	73,82	65,79
	97,45	82,58	56,84	52,59
	90,67	66,79	74,11	61,48
Mittelwert	93,06	80,73	67,03	54,64
SD	3,10	11,81	8,44	11,97
<i>fan1-1</i>	52,96	50,87	23,43	16,77
	81,60	67,57	17,44	19,63
	82,82	40,34	56,75	40,60
	66,46	24,62	18,38	12,26
Mittelwert	70,96	45,85	29,00	22,31
SD	14,12	18,06	18,69	12,56
T-Test gegen WT	0,0488	0,0220	0,0192	0,0098
ND766	93,07	39,32	19,20	21,14
	70,72	47,68	43,68	30,11
	78,64	48,89	54,19	21,51
	81,06	51,35	30,30	13,97
Mittelwert	80,87	46,81	36,84	21,68
SD	9,25	5,22	15,29	6,60
T-Test gegen WT	0,0726	0,0057	0,0202	0,0057
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,2913	0,9243	0,5409	0,9326
ND767	72,11	44,41	22,45	19,10
	78,10	53,78	47,99	36,66
	89,88	59,24	55,70	29,29
Mittelwert	80,03	52,48	42,04	28,35
SD	9,04	7,50	17,41	8,82
T-Test gegen WT	0,1200	0,0121	0,1151	0,0205
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,3492	0,5426	0,3887	0,4889
ND768	88,25	68,64	53,93	38,83
	63,92	48,79	57,58	32,56
	89,08	57,95	43,06	34,64
Mittelwert	76,37	54,33	35,26	27,69
SD	4,18	9,98	11,42	9,97
T-Test gegen WT	0,2632	0,0438	0,0535	0,0433
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,4285	0,2941	0,0918	0,1274
ND769	94,36	77,35	39,12	25,15
	82,47	63,52	41,01	25,20
	74,02	53,06	46,11	25,07
Mittelwert	71,68	52,32	37,69	24,78
SD	9,10	5,72	9,09	3,30
T-Test gegen WT	0,2468	0,1486	0,0051	0,0160
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,2273	0,1615	0,2576	0,6836

Tabelle 8.36: Relative Expression von *FAN1* in den *fan1-1::FAN1* Del UBZ Linien.

In der Tabelle sind die Werte der relativen Expression von *FAN1* in den *fan1-1::FAN1* Del UBZ Linien dargestellt. Zur Normalisierung diente das Haushaltsgen *ACTIN2*. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.14 dargestellt.

	relative Expression
WT	1
	1
	1
	1
Mittelwert	1
SD	0
<i>fan1-1</i>	0,229
	0,216
	0,217
	0,146
Mittelwert	0,202
SD	0,037
ND766	2,045
	1,731
	2,193
	1,567
Mittelwert	1,884
SD	0,286
ND767	0,417
	1,958
	2,063
	1,714
Mittelwert	6,18
SD	2,687
ND768	3,659
	2,922
	4,188
	2,805
Mittelwert	3,394
SD	0,651

	relative Expression
	1,473
	1,22
ND769	1,468
	1,096
Mittelwert	1,314
SD	0,187

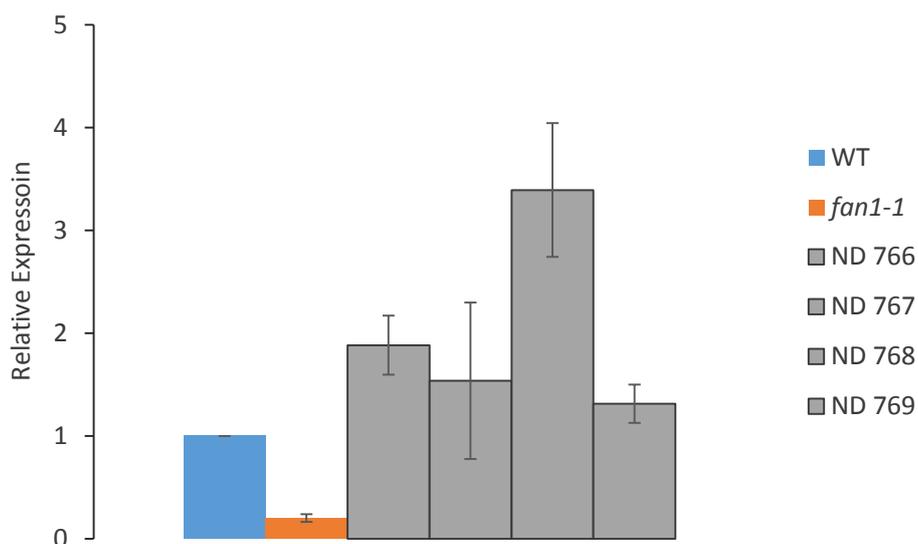


Abbildung 8.14: Relative Expression von *FAN1* in den *fan1-1::FAN1* Del UBZ Linien.

Die Abbildung zeigt die relative Expression von *FAN1* in den *fan1-1::FAN1* Del UBZ Linien, in der *fan1-1* Mutante und im WT.

Tabelle 8.37: Relativer Anteil [%] Wurzeln im Grundzustand.

Die Tabelle zeigt den relativen Anteil an Wurzel [%] mit mindestens einer toten Stammzelle im Grundzustand der Wurzeln von Wildtyp (WT) Pflanzen und *fan1-1*. Dabei wurde zwischen vaskulären Stammzellen (vaskul. SZ), Endodermis (Endod.) SZ, Epidermis (Epid.) SZ, Columella (Colum.) SZ, *transient amplifying* (TA-Zellen) und Zellen des ruhenden Zentrums (Ruh. Zentrum) unterschieden. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

	vaskul. SZ	Endod. SZ	Epid. SZ	Colum. SZ	TA-Zellen	Ruh. Zentrum
WT	0	0	0	0	20	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	10	0
Mittelwert	0	0	0	0	10	0
SD	0	0	0	0	10	0
<i>fan1-1</i>	0	0	0	0	20	0
	0	0	0	0	20	0
	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	0	0	0	0	13,33	0
SD	0	0	0	0	11,55	0

Tabelle 8.38: Relativer Anteil [%] Wurzeln nach MMC-Behandlung.

Die Tabelle zeigt den relativen Anteil an Wurzel [%] mit mindestens einer toten Stammzelle nach Behandlung mit 2,5 µg/ml Mitomycin C in Wurzeln des Wildtyps (WT) und *fan1-1*. Dabei wurde zwischen vaskulären Stammzellen (vaskul. SZ), Endodermis (Endod.) SZ, Epidermis (Epid.) SZ, Columella (Colum.) SZ, *transient amplifying* (TA-Zellen) und Zellen des ruhenden Zentrums (Ruh. Zentrum) unterschieden. Das Ergebnis ist in Abbildung 8.27 dargestellt.

	vaskul. SZ	Endod. SZ	Epid. SZ	Colum. SZ	TA-Zellen	Ruh. Zentrum
WT	20	0	0	0	20	0
	20	0	0	0	20	0
	13,33	0	0	0	13,33	0
Mittelwert	17,78	0	0	0	17,78	0
SD	3,85	0	0	0	3,85	0
<i>fan1-1</i>	40	20	0	0	60	0
	0	20	20	0	40	20
	33,33	13,33	6,67	0	20	13,33
Mittelwert	24,44	17,78	8,89	0	40	11,11
SD	21,43	3,85	10,18	0	20	10,18

Tabelle 8.39: Relative Rekombinationsrate von *fan1-1*.

Die Tabelle zeigt die spontane relative homologe Rekombinationsrate (HR-Rate) [%] der Einzelmutante *fan1-1* und des Wildtyps (WT). Das Ergebnis ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

Linie	Spontane relative HR-Rate [%]
WT	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
	100,00
Mittelwert	100,00
SD	0,000
<i>fan1-1</i>	78,26
	157,68
	111,11
	83,61
	97,81
	66,67
	71,43
	81,47
Mittelwert	93,50
SD	29,59

Tabelle 8.40: Sensitivität der *fan1-1 recq4A-4* Doppelmutante.

Die Linien *fan1-1*, *recq4A-4*, *fan1-1 recq4A-4*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.29 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	57,60	36,90	42,62	34,99
	65,80	54,72	45,97	18,61
	83,07	40,37	27,26	24,56
	85,87	57,42	39,53	23,97
	69,12	59,46	34,20	25,61
	75,12	53,81	15,89	27,63
	70,67	50,78	20,14	17,44
Mittelwert	72,46	50,50	32,23	24,69
SD	9,82	8,61	11,49	5,86
<i>fan1-1</i>	48,55	16,86	15,85	10,15
	57,03	43,30	12,30	18,31
	54,19	30,89	15,61	9,06
	58,54	38,05	16,52	8,73
	50,02	13,56	12,29	12,21
	Mittelwert	82,82	55,97	45,90
SD	10,17	15,62	12,77	7,63
<i>recq4A-4</i>	69,67	47,48	39,43	12,11
	76,16	38,73	20,29	13,09
	52,09	34,57	18,58	13,00
	72,82	53,65	27,31	28,27
	71,39	45,68	19,97	17,70
	61,77	36,71	21,94	21,27
	51,66	29,80	12,25	11,09
Mittelwert	82,82	55,97	45,90	33,20
SD	10,17	15,62	12,77	7,63
<i>fan1-1 recq4A-4</i>	52,79	19,21	10,50	6,53
	44,76	13,34	8,42	7,25
	32,78	17,52	14,30	8,11
	69,43	17,75	11,49	9,66
	49,65	34,75	9,97	6,67
	63,35	38,60	24,54	27,82
Mittelwert	52,13	25,45	13,38	10,65
SD	13,12	10,80	5,40	7,65
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,5531	0,6761	0,6271	0,7649
T-Test gegen <i>recq4A-4</i>	0,0355	0,0116	0,0331	0,1353

Tabelle 8.41: Sensitivität der *fan1-1 mus81-1* Doppelmutante.

Die Linien *fan1-1*, *mus81-1*, *fan1-1 mus81-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.30 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	81,1	50,2	45,5	22,0
	83,35	48,63	29,33	15,89
	69,58	51,46	34,34	24,95
	69,34	39,06	28,77	12,88
	76,70	44,59	34,78	14,20
	89,96	67,13	28,36	30,70
Mittelwert	78,34	50,19	33,51	20,11
SD	8,10	9,45	6,52	6,99
<i>fan1-1</i>	77,22	43,60	20,73	13,05
	73,70	42,66	13,01	8,74
	70,12	32,86	12,50	11,09
	60,93	22,59	9,08	11,74
	56,82	27,47	17,09	8,40
	86,32	45,19	27,24	25,60
Mittelwert	70,85	35,73	16,61	13,10
SD	10,81	9,47	6,58	6,38
<i>mus81-1</i>	40,43	27,12	20,91	16,77
	39,08	36,04	16,76	19,80
	39,51	27,39	24,24	16,35
	33,14	26,39	14,88	16,46
	36,32	21,82	26,78	15,02
	39,62	28,57	28,06	24,38
Mittelwert	38,02	27,89	21,94	18,13
SD	2,77	4,62	5,36	3,44
<i>fan1-1 mus81-1</i>	22,5	18,9	10,2	7,2
	25,07	15,96	13,49	7,2
	22,61	11,64	10,20	7,22
	19,08	10,86	9,00	5,58
	18,41	12,53	11,38	9,85
	35,29	24,60	19,43	24,78
Mittelwert	23,83	15,75	12,28	10,30
SD	6,13	5,28	3,82	7,22
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,0000	0,0021	0,2011	0,4929
T-Test gegen <i>mus81-1</i>	0,0013	0,0018	0,0058	0,0469

Tabelle 8.42: Sensitivität der *fan1-1 rad5A-2* Doppelmutante.

Die Linien *fan1-1*, *rad5A-2*, *fan1-1 rad5A-2*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.31 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	81,09	64,25	45,5	22,0
	98,75	98,30	29,33	15,89
	83,06	69,93	34,34	24,95
	92,88	40,13	28,77	12,88
	81,1	50,2	34,78	14,20
	83,35	48,63	28,36	30,70
Mittelwert	86,70	61,91	33,51	20,11
SD	7,36	20,89	6,52	6,99
<i>fan1-1</i>	66,12	39,61	34,92	15,93
	51,14	51,34	18,50	21,17
	80,96	38,47	15,54	10,33
	96,30	51,29	35,47	23,77
	Mittelwert	73,63	43,14	17,02
SD	19,41	7,12	2,09	5,95
<i>rad5A-2</i>	45,99	17,31	22,44	16,51
	48,27	16,52	16,64	14,41
	34,58	18,91	12,53	14,89
	25,67	11,50	16,28	13,34
Mittelwert	38,02	27,89	21,94	18,13
SD	2,77	4,62	5,36	3,44
<i>fan1-1 rad5A-2</i>	25,33	22,09	13,92	15,36
	30,90	22,42	13,94	17,74
	52,28	21,07	18,06	14,58
	30,30	32,74	19,42	14,80
	32,50	15,30	19,00	15,20
Mittelwert	34,26	24,58	16,87	15,54
SD	10,42	6,30	2,72	1,27
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,0190	0,0044	0,1603	0,5230
T-Test gegen <i>rad5A-2</i>	0,5552	0,0843	0,9662	0,4191

Tabelle 8.43: Sensitivität von der *fan1-1 mhf1-1* Doppelmutante.

Die Linien *fan1-1*, *mhf1-1*, *fan1-1 mhf1-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.32 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	115,02	73,19	75,84	67,37
	106,30	91,27	78,22	69,85
	96,56	66,38	66,64	71,45
Mittelwert	105,96	76,95	73,57	69,56
SD	9,23	12,86	6,12	2,06
<i>fan1-1</i>	77,43	66,34	44,75	30,28
	74,06	67,02	58,21	41,48
	71,42	64,33	36,52	25,88
Mittelwert	74,30	65,90	46,49	32,55
SD	3,01	1,40	10,95	8,04
<i>mhf1-1</i>	98,82	90,24	69,14	62,39
	98,74	76,32	66,40	61,45
	94,73	81,04	59,87	57,83
Mittelwert	97,43	82,53	65,14	60,56
SD	2,34	7,08	4,76	2,41
<i>fan1-1 mhf1-1</i>	65,55	54,89	39,75	35,59
	74,59	68,09	36,30	23,95
	50,94	52,05	44,54	25,34
Mittelwert	63,69	58,34	40,19	28,29
SD	11,94	8,56	4,14	6,36
T-Test gegen <i>fan1-1</i>	0,2604	0,2642	0,4307	0,5143
T-Test gegen <i>mhf1-1</i>	0,0351	0,0208	0,0026	0,0066

Tabelle 8.44: Sensitivität der *fan1-1 fancjb-1* Doppelmutante.

Die Linien *fan1-1*, *fancjb-1*, *fan1-1 fancjb-1*, sowie der Wildtyp (WT) wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml Mitomycin C (MMC) behandelt und das relative Frischgewicht bestimmt. Die relativen Frischgewichte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind in dieser Tabelle aufgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.33 dargestellt.

Linie	relatives Frischgewicht [%] bei			
	5	10	15	20 µg/ml MMC
WT	91,12	78,20	63,36	38,69
	92,99	95,35	73,82	65,79
	97,45	82,58	56,84	52,59
	90,67	66,79	74,11	61,48
Mittelwert	93,06	80,73	67,03	54,64
SD	3,10	11,81	8,44	11,97
<i>fan1-1</i>	52,96	50,87	23,43	16,77
	81,60	67,57	17,44	19,63
	82,82	40,34	56,75	40,60
	66,46	24,62	18,38	12,26
Mittelwert	70,96	45,85	29,00	22,31
SD	14,12	18,06	18,69	12,56
<i>fancjb-1</i>	67,58	44,63	39,0	19,52
	82,95	69,05	38,37	46,34
	52,83	21,13	24,75	18,09
	52,87	36,65	31,31	18,17
Mittelwert	64,06	42,87	33,36	25,53
SD	14,38	20,00	6,71	13,89
<i>fan1-1 fancjb-1</i>	60,11	41,38	24,84	19,21
	64,35	48,70	22,26	14,61
	59,89	35,30	32,58	21,05
	Mittelwert	61,45	41,79	26,56
SD	2,51	6,71	5,37	3,32

Berechnung des Signifikanzniveaus

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

p > 0,05	nicht signifikant;	ns
p ≤ 0,05	signifikant	(*)
p < 0,01	sehr signifikant	(**)
p < 0,001	höchst signifikant	(***)

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert in:

Dangel, N. J., Knoll, A., 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”

Weitere wissenschaftliche Veröffentlichungen:

Knoll, A., Higgins, J. D., Seeliger, K., Reha, S. J., **Dangel, N. J.**, Bauknecht, M., Schropfer, S., Franklin, F. C., Puchta, H. (2012). „The Fanconi anemia ortholog FANCM ensures ordered homologous recombination in both somatic and meiotic cells in Arabidopsis”