

Untersuchung der Rolle der Annealing Helikasen HARP  
und AH2 sowie der Transläsionspolymerase REV3 in der  
DNA-Schadensantwort von *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 Sabrina Kobbe  
aus Karlsruhe

Dekan:	Prof. Dr. Peter Roesky
Referent:	Prof. Dr. Holger Puchta
Korreferent:	Prof. Dr. Reinhard Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2014



# Inhaltsverzeichnis

<b>Nomenklatur</b>	<b>xii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Entstehung und Reparatur von DNA-Schäden . . . . .	1
1.1.1 Entstehung von DNA-Schäden . . . . .	2
1.1.2 Reparatur von DNA-Schäden . . . . .	3
1.1.3 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen . . . . .	5
1.1.4 DNA-Crosslinks und Reparaturvorgänge an Replikationsgabeln . . .	12
1.1.5 RECQ4A und MUS81 . . . . .	16
1.1.6 Die Proteinkinasen ATM und ATR . . . . .	18
1.2 Transläsionspolymerasen . . . . .	19
1.2.1 Die Transläsionspolymerase POL $\zeta$ . . . . .	23
1.3 Helikasen und Annealing Helikasen . . . . .	24
1.3.1 Die Annealing Helikase HARP . . . . .	26
1.3.2 Die Annealing Helikase AH2 . . . . .	28
1.4 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	29
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>30</b>
2.1 Material . . . . .	30
2.1.1 Organismen . . . . .	30
2.1.2 Plasmide . . . . .	31
2.1.3 Enzyme . . . . .	31
2.1.4 Chemikalien . . . . .	32
2.1.5 Genotoxine . . . . .	33
2.1.6 Medien . . . . .	33
2.1.7 Lösungen und Puffer . . . . .	34
2.1.8 Oligonukleotide . . . . .	34
2.1.9 Verbrauchsmaterial und Kits . . . . .	35

---

2.1.10	Geräte . . . . .	35
2.1.11	Software und Datenbanken . . . . .	37
2.2	Methoden . . . . .	37
2.2.1	DNA-Schnellpräparation aus Pflanzengewebe . . . . .	37
2.2.2	RNA-Extraktion aus Pflanzengewebe . . . . .	37
2.2.3	cDNA-Synthese . . . . .	38
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	38
2.2.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten . . . . .	40
2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	40
2.2.7	In-Fusion Klonierung . . . . .	41
2.2.8	Sequenzierungen . . . . .	41
2.2.9	Transformation und Kultur von <i>E. coli</i> . . . . .	41
2.2.10	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> . . . . .	42
2.2.11	Transformation und Kultur von <i>A. tumefaciens</i> . . . . .	42
2.2.12	Transformation und Linientablierung von <i>A. thaliana</i> . . . . .	42
2.2.13	Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis</i> -Samen . . . . .	43
2.2.14	Pflanzenanzucht und Samenlagerung . . . . .	43
2.2.15	Kreuzung von <i>A. thaliana</i> . . . . .	44
2.2.16	Sensitivitätstest mit genotoxischen Agenzien . . . . .	44
2.2.17	UV-B Bestrahlung von Wurzeln . . . . .	45
2.2.18	Rekombinationstests . . . . .	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
3.1	Untersuchungen zur Funktion von HARP und AH2 in <i>A. thaliana</i> . . . . .	48
3.1.1	Charakterisierung von <i>harp</i> - und <i>ah2</i> -T-DNA Insertionsmutanten . . . . .	50
3.1.2	Sensitivitäten von <i>harp</i> - und <i>ah2</i> -Insertionsmutanten gegenüber ge- notoxischem Stress . . . . .	55
3.1.3	<i>AtHARP</i> in der homologen Rekombination . . . . .	56
3.2	Untersuchungen zur Funktion von REV3 in <i>A. thaliana</i> . . . . .	61
3.2.1	Charakterisierung der T-DNA Insertionsmutante <i>rev3-5</i> . . . . .	63
3.2.2	Komplementationsstudien mit REV3 . . . . .	66
3.2.3	REV3 und Faktoren der pflanzlichen DNA-Reparatur . . . . .	75

---

<b>4 Diskussion</b>	<b>81</b>
4.1 Untersuchungen zur Funktion von HARP und AH2 in <i>A. thaliana</i> . . . . .	81
4.1.1 Charakterisierung von <i>harp</i> - und <i>ah2</i> -T-DNA Insertionsmutanten: Insertionsortbestimmung und Expressionsanalysen . . . . .	81
4.1.2 Sensitivitäten von <i>harp</i> - und <i>ah2</i> -Insertionsmutanten gegenüber ge- notoxischem Stress . . . . .	83
4.1.3 <i>AtHARP</i> in der homologen Rekombination . . . . .	86
4.2 Untersuchungen zur Funktion von REV3 in <i>A. thaliana</i> . . . . .	87
4.2.1 Charakterisierung der T-DNA Insertionsmutante <i>rev3-5</i> : Insertions- ortbestimmung und Expressionsanalyse . . . . .	87
4.2.2 Komplementationsstudien mit REV3 . . . . .	88
4.2.3 REV3 und Faktoren der pflanzlichen DNA-Reparatur . . . . .	93
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>6 Summary</b>	<b>98</b>
<b>A Anhang</b>	<b>99</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>127</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>145</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Single Strand Annealing (SSA), das nichtkonservative Modell der HR . . . . .	8
1.2	DSBR, SDSA und BIR, die konservativen Mechanismen der HR . . . . .	10
1.3	PRR: <i>Template switch</i> und TLS . . . . .	13
1.4	Rekombinationsabhängige und -unabhängige Reparatur von Interstrang-Crosslinks . . . . .	15
1.5	Domänenstruktur des menschlichen REV3-Proteins . . . . .	24
1.6	Domänenstrukturen der menschlichen Annealing Helikasen HARP und AH2 . . . . .	27
3.1	Vergleich der Domänenstrukturen von HARP und AH2 im Menschen und <i>Arabidopsis</i> . . . . .	49
3.2	Konservierung der HPL-Domäne in verschiedenen Organismen . . . . .	50
3.3	Aufbau des <i>AtHARP</i> -Gens und Insertionsortbestimmung der <i>harp</i> T-DNA-Mutanten . . . . .	51
3.4	Aufbau des <i>HARP</i> -Gens und Insertionsortbestimmung der <i>harp</i> T-DNA-Mutanten . . . . .	53
3.5	Quantitative Expressionsanalyse der verwendeten <i>harp</i> -Insertionslinien . . . . .	54
3.6	Quantitative Expressionsanalyse der verwendeten <i>ah2</i> -Insertionslinien . . . . .	55
3.7	Reparatur von DNA-Schäden nach MMC-Behandlung in <i>harp ah2</i> Einzel- und Doppelmutanten . . . . .	57
3.8	Reparatur von DNA-Schäden nach HU-Behandlung in <i>harp ah2</i> Einzel- und Doppelmutanten . . . . .	58
3.9	Reparatur von DNA-Schäden nach CPT-Behandlung in <i>harp ah2</i> Einzel- und Doppelmutanten . . . . .	59
3.10	Schematische Darstellung der verwendeten <i>GUS</i> -Reporterkonstrukte . . . . .	61
3.11	Rekombinationsraten der <i>harp</i> -Insertionslinien vor und nach Mutageninduktion . . . . .	62
3.12	Rekombinationsraten der <i>harp</i> -Insertionslinien vor und nach Mutageninduktion: IC9-Konstrukt . . . . .	63
3.13	Rekombinationsraten der <i>harp</i> -Insertionslinien nach I-SceI-Induktion . . . . .	64
3.14	Übersicht über alle verwendeten <i>rev3</i> Insertionslinien und Insertionsortbestimmung der <i>rev3-5</i> -Insertionslinie . . . . .	65

---

3.15	Quantitative Expressionsanalyse der <i>rev3-5</i> -Insertionslinie . . . . .	66
3.16	Übersicht der verwendeten <i>REV3</i> Komplementationskonstrukte . . . . .	67
3.17	In-Fusion Reaktion zur Herstellung des <i>REV3</i> Wildtyp-Komplementationskonstruktes . . . . .	68
3.18	Komplementationsstudien von <i>rev3-2</i> mit dem Wildtyp-Konstrukt . . . . .	70
3.19	Komplementationsstudien von <i>rev3-2</i> mit einem Punktmutation in Motiv A tragenden Konstrukt . . . . .	72
3.20	Komplementationsstudien von <i>rev3-2</i> mit einem Punktmutation in Motiv C tragenden Konstrukt . . . . .	73
3.21	Wurzelwachstum der Komplementationslinien von <i>rev3-2</i> nach UV-B Bestrahlung . . . . .	74
3.22	Reparatur/Toleranz von DNA-Schäden in <i>rev3 recq4a-4</i> Doppelmutanten . . . . .	77
3.23	Reparatur/Toleranz von DNA-Schäden in <i>rev3 mus81-1</i> Doppelmutanten . . . . .	78
3.24	Reparatur/Toleranz von DNA-Schäden in <i>rev3 atr-2</i> Doppelmutanten . . . . .	80
4.1	Funktion von HARP und AH2 an Camptothecin-verursachten Schäden . . . . .	86
4.2	Möglicher Ablauf der Reaktion auf DNA-Läsionen mit WT-REV3 und punktmutiertem REV3 . . . . .	92
4.3	Einteilung von REV3 in die durch RECQ4A, MUS81 und RAD5A vermittelten Antworten auf DNA-Schäden . . . . .	95
A.1	Reparatur von DNA-Schäden nach MMC-Behandlung in <i>harp ah2</i> Einzel- und Doppelmutanten . . . . .	104
A.2	Reparatur von DNA-Schäden nach HU-Behandlung in <i>harp ah2</i> Einzel- und Doppelmutanten . . . . .	105
A.3	Reparatur von DNA-Schäden nach CPT-Behandlung in <i>harp ah2</i> Einzel- und Doppelmutanten . . . . .	106

# Tabellenverzeichnis

2.1	T-DNA Einzelmutanten . . . . .	30
2.2	Plasmide . . . . .	31
2.3	Verwendete Antibiotika . . . . .	34
2.4	PCR Standardprotokoll . . . . .	39
2.5	qRT-PCR Standardprotokoll . . . . .	40
2.6	Genotoxinkonzentrationen der Sensitivitätstests . . . . .	45
A.1	Primerkombinationen und -sequenzen für qRT-PCRs zur Expressionsanalyse . . . . .	99
A.2	Verwendete Klonierungsprimer . . . . .	100
A.4	Verwendete Primer für PCR-basierte Genotypisierungen: Reporterlinien . .	100
A.3	Verwendete Primer für PCR-basierte Genotypisierungen . . . . .	101
A.5	Daten der qRT-PCRs zur Expressionsanalyse . . . . .	102
A.6	Relative Frischgewichte der <i>harp</i> und <i>ah2</i> Einzel- und Doppelmutanten nach CPT Behandlung . . . . .	103
A.7	Genotoxininduzierte Rekombinationstests der <i>harp</i> -Insertionslinien: DGU.US, DU.GUS und IU.GUS . . . . .	107
A.8	Genotoxininduzierte Rekombinationstests der <i>harp</i> -Insertionslinien: IC9 . .	108
A.9	I-Scel-induzierte Rekombinationstests der <i>harp</i> -Insertionslinien . . . . .	109
A.10	Daten der Komplementationsstudien mit MMC-Behandlung: Wildtyp-Konstrukt . . . . .	110
A.11	Daten der Komplementationsstudien mit MMS-Behandlung: Wildtyp-Konstrukt . . . . .	111
A.12	Daten der Komplementationsstudien mit Cisplatin-Behandlung: Wildtyp-Konstrukt . . . . .	112
A.13	Daten der Komplementationsstudien mit MMC-Behandlung: Punktmutationskonstrukt Motiv A . . . . .	113
A.14	Daten der Komplementationsstudien mit Cisplatin-Behandlung: Punktmutationskonstrukt Motiv A . . . . .	114
A.15	Daten der Komplementationsstudien mit MMS-Behandlung: Punktmutationskonstrukt Motiv A . . . . .	115



---

A.16 Daten der Komplementationstudien mit MMC-Behandlung: Punktmutationskonstrukt Motiv C . . . . .	116
A.17 Daten der Komplementationstudien mit Cisplatin-Behandlung: Punktmutationskonstrukt Motiv C . . . . .	117
A.18 Daten der Komplementationstudien mit MMS-Behandlung: Punktmutationskonstrukt Motiv C . . . . .	118
A.19 Daten der Komplementationstudien mit UV-B-Bestrahlung: Wildtyp-Konstrukt . . . . .	119
A.20 Daten der Komplementationstudien mit UV-B-Bestrahlung: Punktmutationskonstrukt Motiv A . . . . .	120
A.21 Daten der Komplementationstudien mit UV-B-Bestrahlung: Punktmutationskonstrukt Motiv C . . . . .	121
A.22 Daten der Sensitivitätstests mit MMC-Behandlung: <i>rev3 recq4a-4</i> Doppelmutanten und Einzelmutanten . . . . .	122
A.23 Daten der Sensitivitätstests mit MMC-Behandlung: <i>rev3 mus81-1</i> und <i>rev3 atr-2</i> Doppelmutanten und Einzelmutanten . . . . .	123
A.24 Daten der Sensitivitätstests mit MMS-Behandlung: <i>rev3 recq4a-4</i> Doppelmutanten und Einzelmutanten . . . . .	124
A.25 Daten der Sensitivitätstests mit MMS-Behandlung: <i>rev3 mus81-1</i> und <i>rev3 atr-2</i> Doppelmutanten und Einzelmutanten . . . . .	125
A.26 Daten der Sensitivitätstests mit Cisplatin-Behandlung: <i>rev3 recq4a-4</i> Doppelmutanten und Einzelmutanten . . . . .	126
A.27 Daten der Sensitivitätstests mit Cisplatin-Behandlung: <i>rev3 mus81-1</i> und <i>rev3 atr-2</i> Doppelmutanten und Einzelmutanten . . . . .	126

# Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
AH2	Annealing Helikase 2
APE1	<i>AP Endonuklease 1</i>
APIM	<i>AlkB Homolog 2 PCNA Interaction Motif</i>
AS	Aminosäure/n
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM- and Rad3-Related</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BIR	<i>Break Induced Replication</i>
BLM	<i>Bloom Syndrome Protein</i>
bp	Basenpaare
BRCA1	<i>breast cancer susceptibility 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer susceptibility 2</i>
BRCT	<i>BRCA1 C-terminal</i>
Cisplatin	<i>cis</i> -Diammindichloroplatin(II)
Col-0	Columbia
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimer
CPT	Camptothecin
D	Asparaginsäure
D-loop	<i>Displacement-Loop</i>
dC	Deoxycytidin
DDT	<i>DNA-Damage Tolerance</i>
dHJ	doppelte <i>Holliday Junction</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	<i>Double-Strand Break Repair</i>
Ec, <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERCC1	<i>Excision Repair Cross-Complementing Group 1</i>
ESB	Einzelstrangbruch
FA	Fanconi Anämie
HARP	<i>HepA-Related Protein</i>
HPL	<i>HARP-Like Domain</i>
HR	homologe Rekombination
HU	Hydroxyurea
IR	ionisierende Strahlung
LB	Left Border
LOH	Verlust von Heterozygotie
MCS	Multiple Cloning Site
MMC	Mitomycin C
MMR	Mismatch-Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat

---

MUS81	.....	<i>MMS and UV Sensitive 81</i>
NER	.....	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	.....	<i>Non-Homologous End Joining</i>
NTP	.....	Nukleosidtriphosphat
OGG1	.....	<i>8-Oxoguanine DNA Glycosylase</i>
PARP1	.....	<i>Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1</i>
PCNA	.....	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PIPB	.....	<i>PCNA-Interacting Protein Box</i>
POL	.....	DNA-Polymerase
POL $\zeta$	.....	DNA-Polymerase $\zeta$
PRR	.....	<i>Post-Replicative Repair</i>
RB	.....	Right Border
RBM	.....	RPA-Bindedomäne
REV	.....	<i>reversionless</i>
ROS	.....	reaktive Sauerstoffspezies
RPA	.....	<i>Replication Protein A</i>
Sc, <i>S. cerevisiae</i>	.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDSA	.....	<i>Synthesis Dependent Strand Annealing</i>
SIOD	.....	Schimke-immunoossäre Dysplasie
SMARCAL1	.....	<i>SWI/SNF2-Related, Matrix-Associated, Actin-Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily A-Like 1</i>
SNF2	.....	<i>Sucrose Nonfermenting 2</i>
SSA	.....	<i>Single Strand Annealing</i>
ssDNA	.....	einzelsträngige DNA
TLS	.....	Transläsionssynthese
TLS-Polymerase	.	Transläsionspolymerase
UBM	.....	Ubiquitin Bindemotiv
UV	.....	ultraviolett
WRN	.....	<i>Werner Syndrome Protein</i>
WT	.....	Wildtyp
XP-V	.....	<i>Xeroderma pigmentosum</i> -Variante
XPF	.....	<i>Xeroderma Pigmentosum Group F</i>
XRCC1	.....	<i>X-Ray Repair Cross-Complementing Group 1</i>
ZNP	.....	Zinkfinger
ZRANB3	.....	<i>Zinc Finger, RAN-Binding Domain Containing 3</i>

---

## Nomenklatur

---

Funktionsfähige Proteine und Gene werden in Großbuchstaben geschrieben, Gene zusätzlich kursiv. Mutanten werden klein und kursiv dargestellt. Die Abkürzung vor dem Gen oder Protein bezeichnet den Organismus.

*AtREV3*: Protein in *Arabidopsis thaliana*

*AtREV3*: Gen in *Arabidopsis thaliana*

*rev3*: Gen mit Mutation, beziehungsweise Protein mit einem Defekt

---

# 1 Einleitung

---

Seit der Entdeckung der DNA durch Friedrich Miescher im Jahre 1869 wuchs in den darauffolgenden Jahrzehnten das Interesse an dem Molekül, von dem wir heute wissen, dass es der Grundstein jedes Lebens ist. Seit Jahrzehnten untersuchen Forscher auf der ganzen Welt das Zusammenspiel von DNA und Proteinen und die damit zusammenhängenden zellulären Prozesse. Zum Einsatz kommen hierfür verschiedene Modellorganismen, die für diese Zwecke besonders vorteilhafte Merkmale besitzen. Einer dieser Modellorganismen ist die Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* aus der Familie der Brassicaceae. Ihre geringe Größe, schnelle Generationszeit von sechs bis acht Wochen und hohe Anzahl an Nachkommen sind nur einige ihrer Vorteile. Ihr Genom ist seit dem Jahr 2000 vollständig sequenziert und immer mehr der Sequenzen lassen sich bestimmten Genen, beziehungsweise Proteinen mit bestimmten Funktionen, zuweisen. Da eine große Anzahl an Genen zwischen verschiedenen, auch entfernt verwandten Organismen konserviert ist, lassen sich häufig Rückschlüsse von Proteinfunktionen eines Organismus auf einen anderen Organismus übertragen. Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise sind Pflanzen häufig DNA-schädigenden Einflüssen ausgeliefert, weswegen für sie eine effiziente DNA-Reparaturmaschinerie und Schadens-Toleranzmechanismen besonders wichtig sind. Oftmals führen Mutationen in den für die Aufrechterhaltung des Genoms verantwortlichen Genen bei Pflanzen nicht zu offensichtlichen Defekten, während die homologen Gene in anderen Organismen essenziell sind. Durch Mutantanalysen in *Arabidopsis* lassen sich die Funktionen des betroffenen Proteins indirekt untersuchen.

Im Zuge dieser Arbeit wurden funktionelle Untersuchungen der Translasepolymerase POL $\zeta$  sowie der Annealing Helikasen HARP und AH2 in *Arabidopsis* durchgeführt. Dies sind Proteine, denen eine Rolle in der Antwort auf DNA-Schäden zugeschrieben wird. Im Folgenden wird daher auf die Entstehung und Reparatur von DNA-Schäden eingegangen und bereits Bekanntes zu den wichtigsten Proteinen dieser Arbeit erläutert.

## 1.1 Entstehung und Reparatur von DNA-Schäden

Als Träger der Erbinformation ist die Integrität der DNA von großer Bedeutung. Um diese sicherzustellen, haben Organismen eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um auf die Folgen von permanent auftretenden exogenen und endogenen schädigenden Einflüssen zu reagieren. Eine hohe Anzahl von DNA-Schäden entsteht auch spontan während des DNA Metabolismus. Unter anderem können während der Replikation trotz Proofreading Funktion der replikativen Polymerasen falsche Nukleotide eingebaut werden oder

Basen können aufgrund von Depurinierung verloren gehen. Schäden wie DNA Einzelstrangbrüche (ESBs) können meist relativ leicht von der Reparaturmaschinerie der Zelle repariert werden können, da der komplementäre DNA-Strang als intakte Matrize zur Verfügung steht. Dahingegen können DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) oder Schäden, die die Replikation behindern, zu chromosomalen Aberrationen, Translokationen oder dem Tod der Zelle führen. Während Mutationen, die durch nicht oder inakkurat reparierte DNA-Schäden entstehen, auf der einen Seite für die Evolution einer Art unabdingbar sind, können sie auf der anderen Seite zu schwerwiegenden Krankheiten wie Krebs führen.

### 1.1.1 Entstehung von DNA-Schäden

Endogene Einflüsse spielen eine große Rolle in der Entstehung von DNA-Schäden. Während des normalen Metabolismus der Zelle entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Nebenprodukte, welche nicht immer komplett von Antioxidantien inaktiviert werden und zu verschiedenen DNA-Schäden wie oxidierten Basen sowie ESBs und DSBs führen können. Exogene Einflüsse können physikalischen oder chemischen Ursprungs sein. Beispielsweise zählen ionisierende Strahlung (IR) oder ultraviolette (UV) Strahlung der Sonne zu den physikalischen genotoxischen Agenzien. UV-Strahlung kann direkt Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs) und (6-4)-Photoprodukte verursachen oder indirekt zur Entstehung von ROS führen (Hoeijmakers, 2009). IR kann DSBs, ESBs und ebenfalls oxidativen Stress verursachen.

Chemische DNA-schädigende Agenzien werden in der Chemotherapie von Krebspatienten eingesetzt und verursachen ein großes Spektrum an DNA-Läsionen. Methylmethansulfonat (MMS) zählt zu den alkylierenden Agenzien und induziert DNA-Schäden, indem es Methylgruppen auf Sauerstoff- oder Stickstoffatome der DNA-Basen überträgt und dadurch Basenläsionen wie 7-Methylguanin und 3-Methyladenin erzeugt. Diese modifizierten Basen können Fehlpaarungen und Replikationsblockaden verursachen. Die durch alkylierende Agenzien verursachten DNA-Schäden werden hauptsächlich durch Basenexzisionsreparatur (BER) und Alkyltransferasen repariert. Außerdem reagieren auch Zellen mit Defekten in der homologen Rekombination (HR) sensitiv auf MMS. Dies ist zum einen auf die HR-vermittelte Antwort auf Replikationsblockaden zurückzuführen und zum anderen darauf, dass während der BER ESBs entstehen, über die durch eine auftreffende Replikationsgabel DSBs entstehen können (Lundin *et al.*, 2005).

Auch das Antibiotikum Bleomycin wird in der Chemotherapie verwendet. Die biologischen Effekte von Bleomycinen beruhen auf einem metallabhängigen, oxidativen Schneiden von DNA an bevorzugten Sequenzen und führen somit zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Einzelstrangbrüche entstehen bevorzugt an Sequenzen der Basenabfolge GTAC, während Doppelstrangbrüche meist an der Basenabfolge GGCC gebildet werden (Hecht, 1986). Das Verhältnis von ESBs zu DSBs beträgt circa 10-20:1. Das im Kontext mit Bleomycinen am besten untersuchte und aktivste Metall ist Fe(II), jedoch können auch andere redoxaktive Metalle wie Cobalt oder Kupfer die induzierten DNA-Brüche auslösen. Sie bilden gemeinsam mit den Stickstoffatomen des Bleomycin-Peptidteils einen festen Chelatkomplex und reagieren mit molekularem Sauerstoff (Harsch *et al.*, 2000).

Zu den DNA-Crosslink verursachenden chemischen Agenzien zählen Mitomycin C (MMC) und *cis*-Diammindichloroplatin(II) (Cisplatin). Hierbei verursacht Cisplatin hauptsächlich kovalente Bindungen zwischen Basen des selben DNA-Stranges (Intrastrang-Crosslinks) und MMC zwischen verschiedenen DNA-Strängen (Interstrang-Crosslinks) (Zamble und Lippard, 1995, Tomasz, 1995). Besonders gefährlich sind Interstrang-Crosslinks, da sie zu Replikationsblockaden und daraus resultierend zu DSBs führen können. Interstrang-Crosslink-verursachende Agenzien generieren neben Interstrang-Crosslinks für gewöhnlich auch andere Arten von DNA-Schäden wie Intrastrang-Crosslinks, Mono-Addukte und DNA-Protein-Crosslinks. Ebenso kann Cisplatin zu einem geringen Anteil auch zu Interstrang-Crosslinks führen. Intrastrang-Crosslinks können über die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) entfernt werden.

Das Genotoxin Camptothecin ist ein Hemmstoff der Topoisomerase I (Hertzberg *et al.*, 1989). Topoisomerasen sind Enzyme, die die DNA schneiden und wieder verschließen, um durch Superspiralisierung der DNA verursachte Torsionen zu lösen und stellen somit einen wichtigen Faktor der Chromatinstabilität dar. Typ I Topoisomerasen schneiden dabei nur einen Strang der DNA, während Typ II Topoisomerasen beide Stränge gleichzeitig schneiden (Übersicht: Champoux, 2001, Pommier, 2006). Beide Typen bilden dabei einen kovalenten Komplex mit ihrem Substrat aus. Camptothecin stabilisiert den kovalenten Komplex zwischen DNA und Topoisomerase I und verhindert die Re-Ligation der DNA nach deren Entwindung. Dieser Vorgang verursacht DNA-ESBs und -DSBs (Hsiang *et al.*, 1985).

Hydroxyurea (HU) inhibiert die DNA-Synthese, indem es das Enzym Ribonukleotid-Reduktase hemmt (Elford, 1968). Dadurch können Ribonukleotide nicht zu den zur DNA-Synthese benötigten Desoxyribonukleotiden reduziert werden. Das Resultat sind stehengebliebene Replikationsgabeln, welche zu DSBs kollabieren können. Sowohl Camptothecin als auch HU induzieren HR.

### 1.1.2 Reparatur von DNA-Schäden

Um auf die Vielzahl der ständig auftretenden DNA-Schäden zu reagieren, gibt es für viele Arten von DNA-Läsionen spezifische Reparaturmechanismen.

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) repariert hauptsächlich UV-induzierte Cyclobutan Pyrimidindimere und (6-4)-Photoprodukte, DNA-Addukte und Crosslinks. Die schadhafte Stelle wird durch Faktoren der NER erkannt, die DNA einzelsträngig in 5'- und 3'-Richtung des Schadens eingeschnitten und ein 25 - 30 bp langer DNA-Abschnitt herausgeschnitten. Anschließend kann die Neusynthese des Stranges erfolgen. Der Schlüsselfaktor der NER ist ein als Endonuklease fungierender Komplex der Proteine *Xeroderma Pigmentosum Group F* (XPF) und *Excision Repair Cross-Complementing Group 1* (ERCC1), wobei eine Reihe weiterer Proteine in die NER involviert ist. Defekte in der NER führen beim Menschen unter anderem zu der Krankheit *Xeroderma pigmentosum*, welche sich durch hohe Empfindlichkeit gegenüber Sonnenlicht und Prädisposition zu Hautkrebs auszeichnet (de Laat *et al.*, 1999, Wood, 1997).

Die Hauptakteure der Basenexzisionsreparatur (BER) sind Glycosylasen, welche verschiedene Arten von modifizierten oder beschädigten Basen entfernen, indem sie die glycosidische Bindung zwischen der Base und der Desoxyribose des Nukleotids spalten. Anschließend wird die AP-Stelle durch eine AP-Endonuklease oder eine AP-Lyase entfernt. Das verbleibende Desoxyribosephosphat wird durch eine Phosphodiesterase herausgeschnitten und die resultierende Lücke durch eine Polymerase geschlossen und anschließend durch eine Ligase verknüpft. Die wichtigsten Proteine sind *X-Ray Repair Cross-Complementing Group 1* (XRCC1), *AP Endonuklease 1* (APE1) und *8-Oxoguanine DNA Glycosylase* (OGG1). XRCC1 fungiert dabei als Plattform-Protein, das die verschiedenen Phasen der BER koordiniert und unter anderem mit APE1 und OGG1 interagiert. Durch BER werden oxidierte, alkylierte oder deaminierte Basen entfernt (Übersicht: Tudek, 2007, Seeberg *et al.*, 1995).

Basen-Fehlpaarungen werden über die sogenannte Mismatch-Reparatur (MMR) repariert. MMR repariert damit beispielsweise die Fehler, die der DNA Polymerase trotz ihrer 3'-5' Exonuklease Proofreadingfunktion unterlaufen, ist aber auch an der Reparatur anderer DNA-Läsionen beteiligt. Basen-Fehlpaarungen können aufgrund ihrer Unfähigkeit, Watson-Crick Basenpaarungen einzugehen, identifiziert werden. Da keines der Nukleotide beschädigt oder modifiziert ist, ist es nicht offensichtlich, welcher Strang den Fehler beinhaltet und Reparatur über BER oder NER wäre nicht sinnvoll. MMR geschieht nur an dem neu synthetisierten DNA-Strang. Dieser wird im eukaryotischen System durch die Lücken zwischen Okazaki Fragmenten des Folgestranges oder des freien 3'-Terminus des Leitstranges identifiziert. Der fehlerhafte Strang wird dann bis über die Fehlpaarung abgebaut und neu synthetisiert. In *Escherichia coli* (*E. coli*) wird MMR durch das Protein MUTS initiiert, welches an dem Mismatch bindet. Weitere MUT-Proteine führen die anschließenden Reaktionen der Reparatur aus. In Eukaryoten sind die beteiligten Proteine analog dazu MUTS Homologe, MSH-Proteine (Siehe Übersicht: Kunkel und Erie, 2005, Stojic *et al.*, 2004).

Ein weiterer Reparaturmechanismus, der in vielen Organismen eine wichtige Rolle bei der Reparatur von UV-induzierten Schäden spielt, ist die Photoreaktivierung. Sie wird als eine der ältesten Reparatursysteme angesehen und beruht auf der Funktion des Enzyms Photolyase. Es gibt Photolyasen, welche spezifisch an CPDs oder an (6-4)-Photoprodukte binden und die Lichtenergie aus Wellenlängen zwischen 300 und 600 nm nutzen, um eine Photoreduktion zu katalysieren. Photoreaktivierung ist in vielen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen wie Archaea, Bakterien, Pilzen und Pflanzen konserviert. In Säugetieren konnte keine Photoreaktivierung nachgewiesen werden (Cleaver, 1966).

DNA-ESBs sind die am häufigsten auftretenden DNA-Schäden überhaupt. Schätzungen zufolge treten zehntausende ESBs pro Zelle und Tag auf. Die Hauptursache für ESBs sind ROS, jedoch entstehen sie auch durch die Komplexbildung der Topoisomerase I mit DNA oder durch die Wirkung von Bleomycin. ESBs werden durch die Bindung von *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1* (PARP1) detektiert, welches zahlreiche nachfolgende Reparaturfaktoren rekrutiert. Die Auswahl der beteiligten Proteine richtet sich nach dem Ursprung und der Struktur des ESB, die Reparatur lässt sich jedoch in vier Grundschritte einteilen:



ESB-Detektion, Prozessierung der DNA-Enden, Reparatursynthese und Ligation. Unreparierte ESBs können durch Auftreffen der Replikationsgabel während der S-Phase des Zellzyklusses zur Formation von DSBs führen (Übersicht: Caldecott, 2008).

Neben den bereits genannten Reparaturmechanismen, welche ESBs, beschädigte Basen oder während der Replikation entstehende Fehler beheben, die nur einen der beiden DNA-Stränge betreffen, gibt es auch Reparaturmechanismen, welche auf die Reparatur von DSBs spezialisiert sind. Ein weiterer Sonderfall der DNA-Reparatur stellen Interstrang-Crosslinks und blockierte Replikationsgabeln dar. Aufgrund der Wichtigkeit der DSB-Reparatur und Reaktion auf Replikationsblockaden werden diese im Folgenden näher beschrieben.

### 1.1.3 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

DSBs können direkt durch IR oder indirekt während der Replikation von beschädigter DNA oder kollabierter Replikationsgabeln entstehen. Auch einige chemische Agenzien können DSBs verursachen (Kapitel 1.1.1). Während DSBs während der Meiose gezielt durch das Protein SPO11 induziert werden und für die HR notwendig sind (Sun *et al.*, 1989, Keeney *et al.*, 1997), stellen sie für somatische Zellen eine große Gefahr dar. Werden sie nicht akkurat repariert, können sie zu Chromosomenverlust, Translokationen oder Umlagerung von genetischer Information führen. Diese Vorgänge können bei Tieren Krebs verursachen oder Apoptose zur Folge haben.

Zur Reparatur von DSBs sind zwei Hauptmechanismen bekannt: Nicht homologe Endverknüpfung (*Non-Homologous End Joining*, NHEJ) und homologe Rekombination (HR). Beide Reparaturmechanismen sind in allen bisher untersuchten Organismen konserviert. Bei der Reparatur über HR werden homologe Sequenzen für die Reparatur des Bruches benötigt. Das NHEJ von DSBs ist ein Mechanismus, bei dem die beiden Enden des Bruches ohne die Verwendung von größeren homologen Sequenzabschnitten zusammengefügt werden können. In *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) werden die Mehrzahl der auftretenden DSBs über HR repariert, während NHEJ bei mehrzelligen Eukaryoten häufig den Hauptweg der DSB-Reparatur darstellt. Dies könnte darin begründet sein, dass die Genome von multizellulären Eukaryoten im Gegensatz zu Hefe zu einem erheblichen Anteil aus repetitiven Sequenzen besteht. HR zwischen den im Genom verteilten repetitiven Sequenzen kann zu Sequenzinsertionen, -deletionen und Translokationen führen. Verwendung von HR ist also dann sinnvoll, wenn in der späten S-, G2- und M-Phasen des Zellzyklus das Schwesterchromatid optimal für die HR positioniert ist (Lieber *et al.*, 2003). Die komplexen Mechanismen des NHEJ und der HR werden in den nächsten Abschnitten näher erläutert.

#### DSB-Reparatur durch NHEJ

Im ersten Schritt des NHEJ binden spezifische Proteine an die Enden des DSB, wodurch die Degradation der Strangenden und somit der Verlust genetischer Information verhindert wird. Im nächsten Schritt werden die Enden durch Protein-Protein-Interaktionen

physisch nebeneinander gelagert. Falls die DNA-Enden direkt ligiert werden können, geschieht das im darauffolgenden Schritt durch eine Ligase. In den meisten Fällen besitzen die Stränge jedoch Enden, welche zunächst prozessiert werden müssen, bevor der Ligationsschritt stattfinden kann. Dies wird durch spezifische Enzyme ausgeführt, welche Läsionen oder Anhänge von den Enden entfernen, wodurch häufig einige Nukleotide auf jeder Seite des Bruchs verloren gehen können. Durch Sequenzanalysen von über NHEJ reparierten DSBs wurde festgestellt, dass in die Reparatur häufig 1 - 4 Nukleotide lange komplementäre Sequenzen, sogenannte Mikrohomologien, involviert sind. Eine ihrer postulierten Funktionen ist die Stabilisierung der zu reparierenden Sequenzen während der Reparatur. Neben den eben erwähnten möglichen Deletionen einiger Nukleotide kann es beim NHEJ auch zu Inversionen oder Translokationen kommen, falls die Enden von DSBs auf zwei oder mehr Chromosomen falsch miteinander verknüpft werden. In menschlichen Zellen wird die Bindung der Strangenden durch einen heterodimeren Proteinkomplex aus KU70 und KU86 (besser bekannt als KU80) ausgeführt. Dies führt zu der Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PKcs) und der Endonuklease ARTEMIS, woraufhin ARTEMIS durch die DNA-PK phosphoryliert wird. Die Enden werden daraufhin durch ARTEMIS und wahrscheinlich durch andere Faktoren prozessiert und anschließend wird der Bruch durch die Ligase IV gemeinsam mit ihrem Kofaktor XRCC4 ligiert (Hefferin und Tomkinson, 2005).

Auch in *Arabidopsis* sind Homologe der für das NHEJ wichtigen Proteine vorhanden. Im Gegensatz zu dem embryoletalen *LIG4*-Knockout bei Mäusen zeigen *Atlig4*-Mutanten keinen auffälligen Phänotyp unter Standardbedingungen, sind jedoch hypersensitiv gegenüber IR und Gammastrahlung. Das gleiche gilt für *Atku80*-Mutanten, während menschliche KU80-defiziente Zelllinien Apoptose eingehen (Friesner und Britt, 2003).

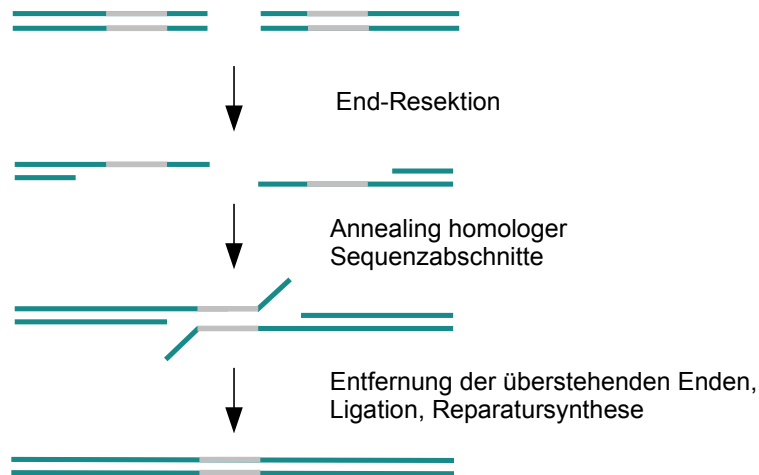
### **DSB-Reparatur durch HR**

Bei der HR werden DSBs repariert, indem unbeschädigte homologe Sequenzen als Matrix für die Reparatur herangezogen werden. Die homologen Sequenzen können sich auf dem Schwesterchromatid, dem homologen Chromosom oder innerhalb des betroffenen Chromosoms an ektopischen Stellen befinden. Wie bereits in 1.1.3 beschrieben, wird die homologe Sequenz des Schwesterchromatids hierbei präferenziell genutzt und bei der folgenden Erläuterung der Reparaturwege repräsentativ genannt. Die HR ist der Hauptweg der Reparatur von DSBs bei Bakterien und einzelligen Eukaryoten (Camerini-Otero und Hsieh, 1995, West, 1997). In *Arabidopsis* kommt diese Art der DSB-Reparatur in somatischen Zellen nur selten vor - die Rate liegt hier etwa bei  $10^{-6}$  (Übersicht: Puchta und Hohn, 1996, Assaad und Signer, 1992, Gal *et al.*, 1991).

Man unterscheidet zwischen der nichtkonservativen Rekombination durch den *Single Strand Annealing* (SSA) Mechanismus und der konservativen HR durch *Synthesis Dependent Strand Annealing* (SDSA), den *Double-Strand Break Repair* (DSBR) Mechanismus und der *Break Induced Replication* (BIR). Eine Gemeinsamkeit aller vier Mechanismen ist eine 5'-3'-Degradation eines Stranges an beiden Enden des Bruches, wodurch zunächst kurze und anschließend längere ssDNA-Abschnitte mit freiem 3'-Ende entstehen. Dieser

Vorgang wird als End-Resektion bezeichnet. Er erfolgt, nachdem der DSB erkannt und die Enden vorprozessiert, das heißt beispielsweise von kovalent verknüpften Proteinen oder DNA-Haarnadelstrukturen befreit wurden. Die Erkennung und Vorprozessierung des DSB geschieht beim Menschen durch einen Komplex aus MRE11-RAD50-NBS1 (MRN; MRE11-RAD50-XRS2, MRX in Hefe) sowie die Endonuklease CtIP (SAE2 in Hefe), welche die Bildung des 3'-Überhanges während der Resektion fördern und beim Menschen die Checkpoint-Kinase ATM aktivieren (Nicolette *et al.*, 2010, Sartori *et al.*, 2007, Lee und Paull, 2005). Die weitreichende 5'-3'-Resektion ist Aufgabe von Helikasen und Nukleasen. Hier seien die 5'-3'-Exonuklease EXO1, sowie die Helikase-Nuklease DNA2 sowie die SF2 RecQ-Helikase BLM (SGS1 in Hefe) genannt (Gravel *et al.*, 2008, Zhu *et al.*, 2008, Mimitou und Symington, 2011). Das Tumorsuppressorprotein BRCA1 interagiert mit MRN und CtIP, fördert die HR und es wird angenommen, dass auch BRCA1 in dem initialen Schritt der Resektion beteiligt ist (Chen *et al.*, 2008b). Die DNA-Resektion ist gefolgt von einer Umlagerung der ssDNA durch das heterotrimere ssDNA-Bindeprotein *Replication Protein A* (RPA), was die Rekrutierung weiterer Proteine zur Folge hat und unter anderem die Bildung einer Haarnadelstruktur an dem ssDNA-Strang verhindert (Wold, 1997, Chen *et al.*, 2013).

Die Reparatur von DSBs durch SSA kann nur dann stattfinden, wenn der DSB von zwei homologen Regionen flankiert wird, welche sich in direkter Orientierung zueinander befinden (Abbildung 1.1). Dabei findet nach der Resektion der Bruchenden ein Annealing der homologen Bereiche statt, woraufhin die überhängenden DNA-Bereiche entfernt und die Enden ligiert werden. Dies führt zu einer Deletion eines homologen Bereiches sowie des Bereiches zwischen den Homologien, weswegen SSA als nicht konservative HR bezeichnet wird. In Hefe bildet das Protein RAD52 eine ringförmige Struktur um ssDNA und ist gemeinsam mit RPA und RAD59 (s. u.) an dem Annealing der homologen Sequenzbereiche beteiligt. Interessanterweise ist RAD51 nicht an dem Annealing der homologen Bereiche involviert (Shinohara *et al.*, 1998). RAD51 spielt eine Schlüsselrolle in der Homologiesuche in den konservativen Wegen der HR und ist im nächsten Abschnitt näher beschrieben. Für die Entfernung der aus dem Annealing resultierenden überhängenden 3'-Enden werden Endonukleasen benötigt. In Hefe ist dafür ein Komplex aus RAD1-RAD10 (Orthologe von XPF und ERCC1, siehe NER in Kapitel 1.1.2) zuständig, welcher auch bei der Entfernung nicht-homologer Abschnitte der freien 3'-Überhänge während der konservativen HR involviert ist. In *S. cerevisiae* interagiert das Protein SLX4 mit RAD1-RAD10 und ist essenziell für den SSA-Mechanismus (Toh *et al.*, 2010). Im Menschen wurden im Jahr 2013 Mutationen im menschlichen homologen Gen *SLX4* aufgrund gesteigerter Sensitivitäten gegenüber Interstrang-Crosslink erzeugenden Agenzien mit der Krankheit Fanconi Anämie (siehe Seite 14) in Verbindung gebracht, weswegen als weiterer Name FANCP gewählt wurde. Sowohl in Hefe als auch im Menschen interagiert SLX4 mit einer Vielzahl an Proteinen und stimuliert ihre enzymatischen Aktivitäten. Auch der MUS81-EME1-Komplex (Kapitel 1.1.5) sei an dieser Stelle als Interaktionspartner von SLX4 genannt. Die genaue Funktion von SLX4/FANCP ist bis heute nicht geklärt (Übersicht: Cybulski und Howlett, 2011).

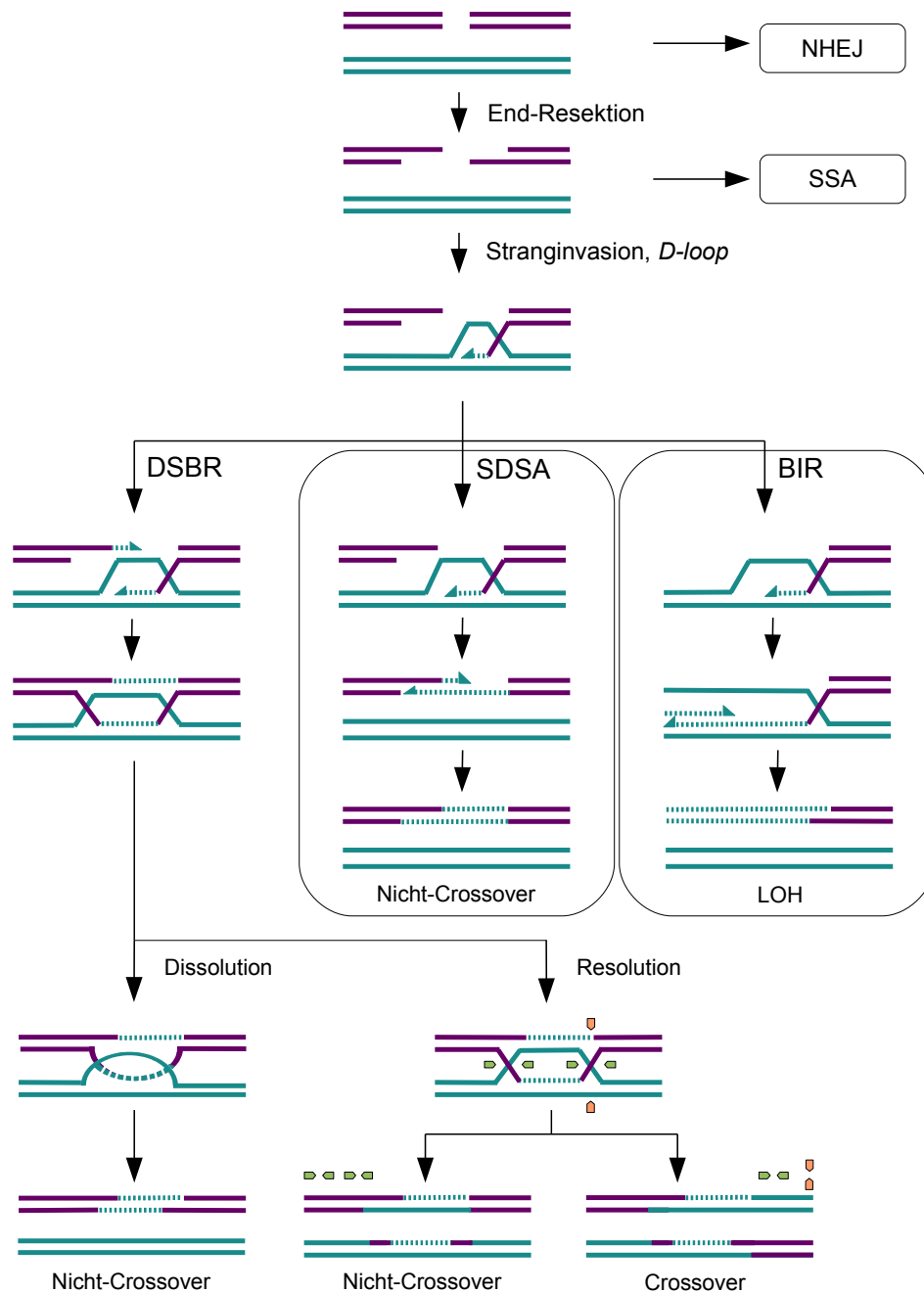


**Abbildung 1.1: SSA, das nichtkonservative Modell der HR.** Dieses Modell greift für die Reparatur von DSBs, welche von nahegelegenen Sequenzwiederholungen (hier als graue Abschnitte dargestellt) flankiert werden. Nach 5'-3'-Resektion der Bruchenden erfolgt ein Annealing der homologen Sequenzabschnitte, woraufhin die überlappenden Strangenden entfernt werden. Der Bruch wird dann über Ligation und Reparatursynthese geschlossen. Die sich zwischen den Homologien liegenden Sequenzen werden bei dieser Art der HR deletiert (verändert nach Bleuyard *et al.*, 2006).

Bei den konservativen Wegen der HR wird das freie 3'-Hydroxylende der ssDNA nach der Resektion genutzt, um in die homologe DNA-Region zu invadieren. Das zwischen Organismen hoch konservierte, auch als Rekombinase bezeichnete Protein RAD51 interagiert hier bei Eukaryoten mit RPA, mit dem es um die ssDNA-Bindung kompetiert (Golub *et al.*, 1998). RAD51 ist ein Homolog des bakteriellen Rekombinationsproteins RECA, mit dem es strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten teilt. RAD51 bindet an DNA und spielt eine bedeutende Rolle in mitotischer und meiotischer Rekombination und DSB-Reparatur, indem es in Abhängigkeit von ATP ssDNA mit homologer dsDNA paart und den Strangaustausch zwischen den synapsierten Strängen katalysiert (Shinohara *et al.*, 1992, Sung und Roberson, 1995, Sung, 1994). RPA wird für die Bildung des präsynaptischen Komplexes durch RAD51 von der ssDNA verdrängt (Sugiyama *et al.*, 1997). In Hefe gehört RAD51 zu der RAD52 Epistasisgruppe, in die außerdem auch RAD50, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, MRE11 und XRA2 gehören. Mitglieder der Gruppe sind an den Prozessen der HR, dem NHEJ, Chromatinstrukturierung oder der Zellzykluskontrolle beteiligt und die meisten von ihnen wurden in Hefe durch ihre Notwendigkeit in der Reparatur von IR-Schäden identifiziert. Das namensgebende Protein der Gruppe, RAD52, interagiert physikalisch mit RAD51 und fungiert bei dessen Rekrutierung an die ssDNA (Sung, 1997). Menschliches RAD52 ist ein ringförmiges Protein aus mehreren Untereinheiten. RAD52-defiziente Hefezellen sind extrem sensitiv gegenüber Strahlung und sind in ihrer mitotischen und meiotischen Rekombination sowie bei der Sporenproduktion eingeschränkt (Mortimer *et al.*, 1981). Im Vergleich dazu zeigen Vertebratenzellen mit RAD52-Defizienz nur einen leichten Rückgang der HR und sind nicht hypersensitiv gegenüber IR (Rijkers *et al.*, 1998). Der Grund dafür wird dem Tumorsuppressorprotein *breast*

*cancer susceptibility 2* (BRCA2) zugeschrieben, welches unter anderem in Vertebraten und Pflanzen vorkommt und den Effekt von *RAD52*-Mutationen auf HR und DNA Reparatur unterbindet. BRCA2 ist hier unter anderem für die Regulation des Aufbaus und der Aktivität des RAD51-Filamentes zuständig (Esashi *et al.*, 2007). Beim Menschen führen Mutationen in *BRCA2* zu einem stark erhöhten Brustkrebsrisiko (Wooster *et al.*, 1995). In BRCA2-defizienten Zellen wird intaktes RAD52 jedoch benötigt, weswegen ihm die Teilnahme an einem BRCA2 unabhängigen oder alternativen Reparaturweg der HR zugeschrieben wird (Feng *et al.*, 2011). Die Reparatur von DSBs erfordert direkten Zugang der Reparaturfaktoren zur DNA. Dieser Prozess wird durch ATPasen der SWI2/SNF2-Familie erleichtert, welche als *Chromatin Remodeling* Enzyme DNA von den Histonen und anderen gebundenen Proteinen lösen. RAD54 ist eines dieser Enzyme und trägt die katalytische Domäne der SF2-Familie der Helikasen (Kapitel 1.3; Übersicht: Thomä *et al.*, 2005). Neben seiner Aufgabe als *Chromatin Remodeling* Protein interagiert RAD54 mit RAD51, stabilisiert das präsynaptische Filament und stimuliert die Stranginvasion (Golub *et al.*, 1997, Mazin *et al.*, 2000). Bei der Invasion in den homologen Bereich der dsDNA entsteht ein sogenannter *Displacement-Loop* (*D-loop*), in welchem das freie 3'-Ende des invadierenden Stranges als Primer für die Synthese über den Templatestrang dient. Die sogenannte *D-loop* Extension wird durch eine DNA-Polymerase ausgeführt. Für diese Funktion kommen eine Vielzahl an Polymerasen in Frage, wie unter anderem POL $\delta$  und Transläsionspolymerasen (Sebesta *et al.*, 2013). Die Transläsionspolymerase POL $\eta$  ist beispielsweise gemeinsam mit RAD52 und RPA an der *D-loop* Extension in menschlichen Zellen beteiligt (McIlwraith und West, 2008; siehe auch Kapitel 1.2). Homologe der RAD52-Gruppe wurden in vielen Eukaryoten identifiziert und einige konnten auch bei Archaea und Prokaryoten gefunden werden (siehe Übersicht: Symington, 2002). Die RAD52 Epistasiegruppe in Pflanzen ähnelt der in Vertebraten und für einige der Mitglieder (wie RAD50, MRE11, RAD51 und vier RAD51 Paraloge) konnte eine Funktion in der HR nachgewiesen werden (Übersicht: Bleuyard *et al.*, 2006). Ein Homolog für RAD52 konnte erst im Jahr 2011 identifiziert werden (Samach *et al.*, 2011). Alle konservativen Wege der HR teilen diese beschriebenen ersten Schritte. In Abbildung 1.2 sind die Vorgänge der konservativen HR-Mechanismen dargestellt.

Bei dem DSBR-Mechanismus werden beide homologen Stränge des Schwesterchromatids zur Neusynthese des schadhafte Doppelstranges genutzt (Szostak *et al.*, 1983). Dies geschieht, indem der invadierte Strang verlängert und der *D-loop* vergrößert wird, bis der Bereich des anderen Bruchendes erreicht ist. Gleichzeitig wird der verdrängte Strang des *D-loops* als Matrize zur Synthese des nicht-invadierten 3'-Überhanges genutzt. Das Annealing des zweiten Stranges wird über RAD52 vermittelt. Die dabei entstehende Struktur wird doppelte *Holliday Junction* (dHJ) genannt und kann auf verschiedene Mechanismen aufgelöst werden. Der als Resolution bezeichnete Mechanismus beruht auf der Funktion von strukturspezifischen Endonukleasen, die als HJ-Resolvasen bezeichnet werden. Sie schneiden die dHJ an den Kreuzungspunkten der Stränge, wodurch entweder Crossover- oder Nicht-Crossover-Ereignisse entstehen. Bei Crossovern wird das gesamte Chromosom ab dem Schnitt zwischen den Rekombinationspartnern ausgetauscht, während bei Genkonversionen lediglich ein kürzerer Abschnitt getauscht wird.



**Abbildung 1.2: DSBR, SDSA und BIR, die konservativen Mechanismen der HR.** Bei diesen Mechanismen kommt es nach Resektion der 5'-Enden zu einer Invasion der 3'-ssDNA in einen homologen Donor-Duplex, wodurch ein *D-loop* gebildet wird. Bei der DSBR wird neben der Synthese des invadierenden 3'-Überhangs zugleich der im *D-loop* verdrängte Strang des Donorduplex als Matrize zur Synthese des nicht-invadierenden Stranges genutzt. Die dadurch entstandene doppelte *Holliday Junction* kann auf zwei Wege aufgelöst werden: Resolution und Dissolution. Bei der Resolution schneiden HJ-Resolvasen an den Strangüberschneidungen der dHJ, was je nach Ausrichtung der Schnitte entweder zu einem Nicht-Crossover (gleiche Orientierung der Schnitte) oder einem Crossover (unterschiedliche Orientierung der Schnitte) führen kann. Bei der Dissolution kommt es ausschließlich zu Nicht-Crossovers. Bei dem SDSA-Modell findet die DNA-Synthese an diesem 3'-Überhang statt, anschließend wird der synthetisierte Strang freigesetzt. Dieser wird wieder mit dem ursprünglichen 5'-Ende verbunden und die Synthese des komplementären Stranges kann stattfinden. Bei der Reparatur über BIR kommt es zur Replikation des kompletten Chromosoms ab der Bruchstelle. Als Matrize dient das homologe Chromosom, weswegen dieser Mechanismus zum Verlust der Heterozygotie (LOH) führt (verändert nach Haber, 2000, Szostak *et al.*, 1983, McEachern und Haber, 2006).

Neben der Resolution gibt es zusätzlich den Weg der Dissolution zur Auflösung der dHJs, wodurch Crossover unterdrückt werden. Dieser Vorgang wird durch den RTR-Komplex ausgeführt, der aus einer RecQ-Helikase, einer Typ IA Topoisomerase und dem Strukturprotein RMI1 besteht. Die RecQ-Helikase SGS1 (BLM im Menschen, Kapitel 1.1.5) und die Helikase SRS2 unterdrücken in Hefe Crossover im Zusammenhang mit DSBs in mitotischen Zellen durch unterschiedliche Mechanismen. Dabei wird postuliert, dass SGS1 die beiden Seiten der dHJ auf einander zubewegt und die Topoisomerase TOPIII das entstehende, sogenannte Hemicatenan auflöst (Ira *et al.*, 2003). Auch in *Arabidopsis* konnte der RTR-Komplex aus RMI1, TOP3 $\alpha$  sowie der RecQ-Helikase RECQ4A nachgewiesen werden (Hartung *et al.*, 2008). Gerade im Zusammenhang mit Crossover wird DSBR als wichtiger Mechanismus zur Reparatur von meiotischen DSBs gesehen, der in mitotischen Zellen unterdrückt wird. Crossover führen zu reziproken Translokationen und zum Verlust von Heterozygotie (LOH) über große Bereiche, was beispielsweise zum Verlust von intakten Allelen von Tumorsuppressorgenen und dadurch zu Krebs führen kann (Huang *et al.*, 1992).

Im Zuge der Reparatur über SDSA wird bei der Hefe der neusynthetisierte DNA-Strang aus dem *D-loop* gelöst und wieder mit seinem ursprünglichen Ende verknüpft. Die Aufhebung des *D-loops* geschieht über die SF1 Helikase SRS2, die das ssDNA-RAD51-Filament auflösen kann (Krejci *et al.*, 2003). Ein funktionelles Analogon von SRS2 im Menschen ist die Helikase und Antirekombinase RTEL1 (Barber *et al.*, 2008). Die Synthese des zweiten beschädigten Stranges kann dann mit dem neusynthetisierten Strang als Template geschehen. Dieser Mechanismus führt zu Nicht-Crossover-Ereignissen, welche nur bezüglich eines kurzen Abschnittes zu LOH führen können. Aus diesem Grund wird SDSA als einer der häufigsten HR-Mechanismen in somatischen Zellen gesehen.

Während der BIR, welche auch als *Recombination-Dependent Replication* oder *Break-Copy Duplication* bekannt ist, wird nach der Stranginvasion eine prozessive Replikationsgabel etabliert, welche ihre Funktion bis zum Ende des Chromosoms ausführt. Hierbei wird im Gegensatz zu SDSA, bei dem nur Leitstrang-Synthese genutzt wird, Leitstrang- und Folgestrang-Synthese benötigt und führt zum LOH von Beginn des Bruches bis zum Ende des Chromosoms. BIR wird häufig dann eingesetzt, wenn nur eines der Strangenden des DSBs Homologien zu anderen Sequenzen des Genoms aufweist. Es spielt bei der Reparatur von stehengebliebenen oder kollabierten Replikationsgabeln sowie bei dem Erhalt von erodierenden Telomeren in Zellen ohne Telomerase eine Schlüsselrolle. Obwohl die meisten Zellen zum Erhalt der Telomere die Telomerase einsetzen, nutzen einige stattdessen oder zusätzlich Rekombination. Darunter fallen einige menschliche Krebszellen (McEachern und Haber, 2006).

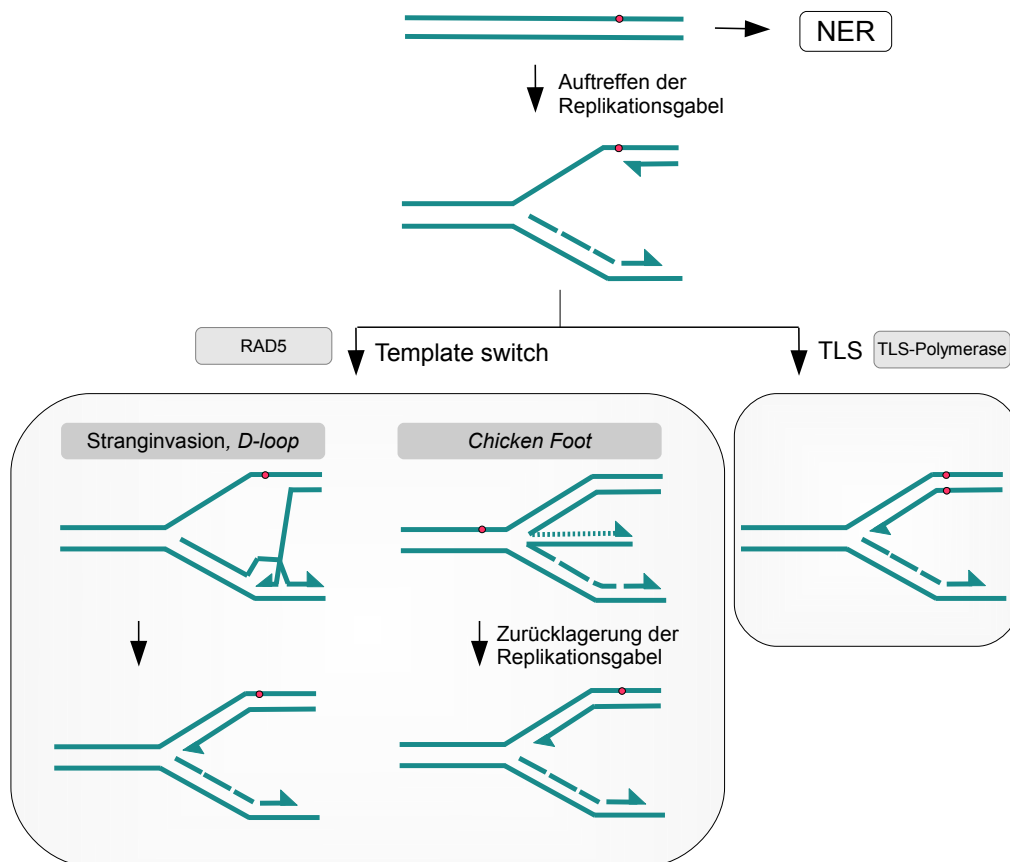
Obwohl HR primär aufgrund ihrer Rolle in der Reparatur von DSBs untersucht wird, liegt eine weitere wichtige Aufgabe in der Reparatur von blockierten oder kollabierten Replikationsgabeln.

#### 1.1.4 DNA-Crosslinks und Reparaturvorgänge an Replikationsgabeln

DNA-Läsionen, die das Voranschreiten der replikativen DNA Helikase oder DNA Polymerase verhindern, können zu einer Blockierung oder zum Kollaps der Replikationsgabel sowie zu einseitigen DSBs führen. Wenn eine Läsion zwar die Polymerase, jedoch nicht die Helikase blockiert, können durch eine Entkoppelung der beiden Funktionen lange ssDNA-Abschnitte entstehen, welche Ziele von Endonukleasen darstellen und zu einseitigen DSBs führen können. Ebenso führen nicht reparierte ESBs durch das Auftreffen der Replikationsgabel zu einseitigen DSBs (Übersicht: Branzei und Foiani, 2010). Da Intrastrang-Crosslinks genau wie Läsionen wie Alkylierungen oder andere Addukte nur einen der beiden DNA-Stränge betreffen, können sie durch NER oder im Falle einer Replikationsbehinderung über *Post-Replicative Repair* (PRR; auch *DNA-Damage Tolerance*, DDT) genannt) umgangen werden. Durch diese Art der Schadenstoleranz werden die DNA-Läsionen zwar nicht repariert, jedoch ist durch sie das Fortschreiten der Replikation gewährleistet. Die PRR ist am besten in *Saccharomyces* untersucht und lässt sich in zwei Wege einteilen: die fehlerbehaftete und die fehlerfreie PRR (Broomfield *et al.*, 2001; Abbildung 1.3). Der fehlerbehaftete Weg beinhaltet einen *Polymerase switch* genannten Vorgang, bei dem die replikative Polymerase durch eine Transläsions-Polymerase (TLS-Polymerase) ausgetauscht wird. TLS-Polymerasen sind durch ihre strukturellen Eigenschaften in der Lage, deformierte DNA als Matrize zur Replikation zu nutzen. Dieser Vorgang kann aufgrund mangelnder Proofreading Funktion der TLS-Polymerasen mit dem Einbau falscher Nukleotide behaftet sein (siehe Kapitel 1.2). Der fehlerfreie Weg beruht auf zwei verschiedenen *Template switch*-Mechanismen. Zum einen kann es zur Stranginvasion und damit zu einem *D-loop* kommen, wodurch die Synthese über den schadhaften Bereich mithilfe des unbeschädigten Schwesterstranges stattfinden kann. Zum anderen kann eine sogenannte *Chicken Foot*-Struktur gebildet werden (Atkinson und McGlynn, 2009). Diese besondere Form der HJ entsteht, wenn der unbeschädigte Schwesterstrang, welcher bereits über den Bereich des Schadens verlängert wurde, durch Umlagerung der Replikationsgabel als Matrize für die Synthese des homologen Stranges genutzt wird (vgl. Abbildung 1.3). Die *Template Switch* Mechanismen werden durch das multifunktionale Protein RAD5 vermittelt, welches in der PRR in Hefe eine Schlüsselrolle einnimmt. Es gehört zu der SWI2/SNF2-Familie der ATPasen, zeigt DNA-abhängige ATPase-Aktivität und trägt ein für Ubiquitinligasen charakteristisches RING-Motiv (Johnson *et al.*, 1992).

Biochemische Analysen zeigten, dass RAD5 eine strukturspezifische Helikase ist, welche die Regression der Replikationsgabel ausführen kann (Blastyák *et al.*, 2007). Aber auch für andere Proteine wird eine Funktion bei Umlagerungsprozessen der Replikationsgabel postuliert. Genannt seien an dieser Stelle die Annealing Helikasen HARP und AH2 (Kapitel 1.3) sowie die RecQ-Helikase BLM. Die HJ in Form des *Chicken Foots* kann ein Ziel für HJ-spezifische Endonukleasen darstellen, welche auch an der Auflösung der bei HR auftretenden HJs eine Rolle spielen. Dadurch entsteht ein DSB an der Replikationsgabel, welcher über BIR repariert werden kann (Kapitel 1.1.3, Übersicht: Haber und Heyer, 2001) Die beiden Wege der PRR werden durch Ubiquitinierungen von PCNA durch den RAD6-RAD18-Komplex reguliert (Übersicht in Mailand *et al.*, 2013).





**Abbildung 1.3: Die Mechanismen der PRR: *Template switch* und TLS.** DNA-Läsionen wie Alkylierungen oder Intrastrang-Crosslinks können, wenn sie nicht rechtzeitig über NER entfernt werden, zur Blockierung der Replikationsgabel führen. Zwei Grundmechanismen der PRR kommen zur Toleranz des Schadens in Frage: Der *Template switch* Mechanismus und die Reparatur über TLS. Der RAD5-abhängige *Template switch* Mechanismus lässt sich erneut in zwei Mechanismen einteilen. Zum einen kann es zur Stranginvasion in den unbeschädigten Duplex und dadurch zur *D-loop*-Bildung kommen, wobei die Synthese von dort aus über den geschädigten Bereich getätigt wird. Zum anderen kann die Replikationsgabel von der Schadensstelle aus zurückgeschoben werden und zur Synthese über den Bereich der Läsion der neusynthetisierte Schwesterstrang herangezogen werden. Nach Zurücklagerung der Replikationsgabel kann die Replikation fortgeführt werden. Bei dem Mechanismus über TLS replizieren TLS-Polymerasen auf potentiell fehlerbehaftete Weise über die Läsion, woraufhin sie durch die replikative Polymerase ausgetauscht werden und die Replikation weiter vollzogen werden kann.

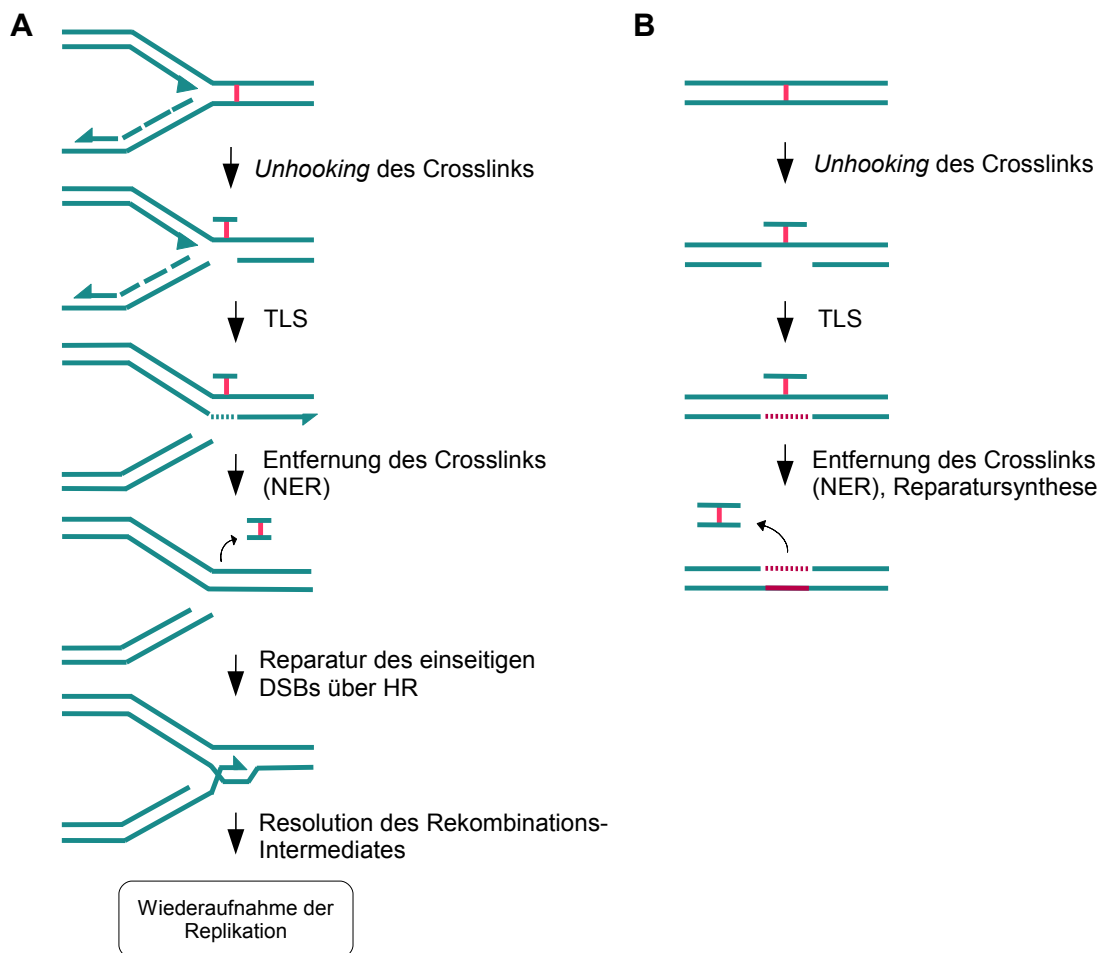
Da DNA Interstrang-Crosslinks die beiden DNA-Stränge der Doppelhelix kovalent verknüpfen, können diese nicht durch die Replikations- und Transkriptionsmaschinerie getrennt werden. Interstrang-Crosslink-verursachende Agenzien wirken daher hoch cytotoxisch. Dies gilt vor allem für sich häufig teilende Zellen, weswegen Interstrang-Crosslink-bildende chemische Agenzien häufig erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt werden. Da durch DNA-Crosslink erzeugende Agenzien verursachte Läsionen in transkriptionell wenig aktiven Bereichen häufig erst während der Replikation in der S1-Phase des Zellzyklus ein Problem für die Zelle darstellen, sind die Reparaturmechanismen für DNA-Crosslinks und blockierte Replikationsgabeln in den meisten Fällen nicht voneinander zu trennen. Zudem können an einem Replikationsblock durch Endonukleasen wie den MUS81-EME1-Komplex gezielt DSBs induziert werden, weswegen eine strikte Abgrenzung der Reparaturmechanismen an durch Genotoxine verursachte Schäden nicht möglich ist (Hanada *et al.*, 2006). In transkriptionell aktiven Bereichen wird die Interstrang-Crosslink-Reparatur durch die Blockierung der RNA-Polymerase eingeleitet (Enoiu *et al.*, 2012). Die Reparatur von Interstrang-Crosslinks ist ein hochkomplexer Mechanismus, der noch nicht vollständig verstanden ist. Jedoch konnten anhand der Identifikation verschiedener an der Interstrang-Crosslink-Reparatur beteiligter Proteine mehrere Reparaturmodelle aufgestellt werden (Übersicht: McHugh *et al.*, 2001, Dronkert und Kanaar, 2001, Deans und West, 2011).

Die Notwendigkeit für Reparaturmechanismen für Interstrang-Crosslinks bei Vertebraten spiegelt sich in der seltenen Erbkrankheit *Fanconi Anämie* (FA) wider, welche sich in den FA-defizienten Zelllinien durch eine extreme Sensitivität gegenüber Interstrang-Crosslink-verursachenden Agenzien wie MMC oder Diepoxybutan, sowie anderen replikationsblockierenden Agenzien wie HU oder UV-Strahlung, jedoch nicht gegenüber anderen DNA-Schäden ausdrücken. Das klinische Bild der Krankheit umfasst Fehlbildungen, Kleinwuchs, Rückbildung des Knochenmarks und damit verbundene Anämie sowie eine Prädisposition gegenüber Leukämie und anderen Krebsarten (Niedernhofer *et al.*, 2005).

Bei Vertebraten ist eine große Anzahl an Proteinen an der Reaktion auf Interstrang-Crosslinks beteiligt. Neben mindestens 16 FA-Genprodukten werden auch Proteine der HR, inbegriffen RecQ-Helikasen, an der Resistenz gegenüber Interstrang-Crosslinks benötigt. Auch für strukturspezifische Endonukleasen wie MUS81-EME1 und den an der NER beteiligten Faktor XPF-ERCC1 sowie für TLS-Polymerasen konnte eine Rolle in der Interstrang-Crosslink-Reparatur nachgewiesen werden (Ho und Schärer, 2010, Bhagwat *et al.*, 2009, Vare *et al.*, 2012). Die Vielzahl der unterschiedlichen involvierten Proteinklassen weist auf verschiedene Reaktionsmöglichkeiten auf Interstrang-Crosslinks und damit verbundene blockierte Replikationsgabeln in Vertebraten hin. Nojima und Kollegen testeten verschiedene Mutantenlinien aus DT40-Zellen aus Hühnern auf Sensitivitäten gegenüber Cisplatin und MMC und konnten so zeigen, dass FA-, TLS- sowie HR-defiziente Zellen hypersensitiv auf crosslinkende Agenzien reagieren, während NER im Vergleich zum Hefemodell eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. REV3-, gefolgt von FA-defizienten Zellen zeigten die höchste Sensitivität gegenüber Cisplatin (Nojima *et al.*,

2005). Bei REV3 handelt es sich um die katalytische Untereinheit der TLS-Polymerase POL $\zeta$  (Kapitel 1.2.1).

Zwei grundsätzliche Mechanismen sind für die Reaktion auf Interstrang-Crosslinks beschrieben worden: ein rekombinationsabhängiger und ein rekombinationsunabhängiger Mechanismus (Abbildung 1.4). Der rekombinationsabhängige Mechanismus wird wäh-



**Abbildung 1.4: Rekombinationsabhängige und -unabhängige Reparatur von Interstrang-Crosslinks.**

Die vereinfachte Abbildung zeigt zwei Mechanismen der Reparatur von Interstrang-Crosslinks. (A) Die rekombinationsabhängige Reparatur von Interstrang-Crosslinks geschieht während der späten S- oder G2-Phase und umfasst ein *Unhooking* der kovalent verknüpften Nukleotide eines Stranges, wodurch eine TLS-Polymerase vermittelte Reparatursynthese über die Läsion erfolgen kann. Anschließend erfolgt die Entfernung des Crosslinks des zweiten Stranges über NER. Der durch das *Unhooking* entstandene einseitige DSB kann über HR repariert werden. Nach Resolution des entstehenden Rekombinationsintermediates kann die Replikation wieder aufgenommen werden. (B) Während der G1-Phase werden Interstrang-Crosslinks über einen rekombinationsunabhängigen Mechanismus repariert. Auch hier findet ein *Unhooking* des Interstrang-Crosslinks, gefolgt von einer TLS, statt. Daraufhin wird der Crosslink über NER herausgeschnitten und die Reparatursynthese der Lücke kann stattfinden. Da die DNA-Synthese durch TLS-Polymerasen nicht immer fehlerfrei verläuft, können durch diesen Mechanismus potenziell Mutationen entstehen (dargestellt als roter Bereich). Verändert nach Wang, 2007, Huang und Li, 2013).

rend der späten S- oder G2-Phase angewandt, wenn eine homologe DNA-Sequenz in Form des Schwesterchromatids zur Verfügung steht. Trifft die Replikationsgabel auf einen Interstrang-Crosslink, wird der Schaden aus einem Zusammenspiel von Endonukleasen, TLS, HR und NER repariert. Strukturspezifische Endonukleasen wie MUS81-EME1

oder XPF-ERCC1 fügen einseitig Schnitte in 5'- und 3'-Richtung des Interstrang-Crosslinks ein, wodurch ein *Unhooking* des Crosslinks stattfindet. Die daraus resultierende Lücke kann durch TLS-Polymerasen geschlossen werden und der dazu komplementäre Strang mit dem anhängenden Crosslink wird über NER repariert. Die Schnitte zum *Unhooking* des Crosslinks führen außerdem zu einem einseitigen DSB, welcher über HR repariert wird. Die Auflösung der entstandenen Rekombinationsintermediate geschieht beispielsweise durch BLM oder FA-Helikasen, woraufhin die Replikation wieder aufgenommen werden kann (Suhasini und Brosh Jr, 2012). FA-Proteine sind an mehreren Schritten dieses Reparaturmechanismus beteiligt. Sie regulieren die drei grundlegenden Reparaturmechanismen der Reaktion auf Interstrang-Crosslinks: die Einschnitte durch Endonukleasen, TLS und HR. Beispielsweise wird für FANCD1 eine Rolle bei der Rekrutierung der TLS-Polymerasen postuliert und FANCD2 initiiert die Stressantwort, indem es die Läsion detektiert und unter anderem die Aktivierung von ATR fördert (Übersicht: Kim und D'Andrea, 2012). Der rekombinationsunabhängige Mechanismus erfolgt hauptsächlich während der G1-Phase. Auch hier findet ein *Unhooking* des Crosslinks statt, woraufhin eine TLS-Polymerase die Reparatursynthese ausführt. Durch die Synthese durch TLS-Polymerasen kann es zum Einbau falscher Nukleotide während dem rekombinationsunabhängigen Mechanismus kommen.

### 1.1.5 RECQ4A und MUS81

Aufgrund ihrer Wichtigkeit für die vorliegende Arbeit werden im Folgenden die Funktionen der Endonuklease MUS81 sowie RecQ-Helikasen im Kontext von Reparatur- und Rekombinationsvorgängen näher erläutert.

#### RECQ4A

RecQ-Helikasen sind an DNA Reparatur-, Rekombinations- und Replikationsvorgängen beteiligt und sind daher eine wichtige Proteinklasse für die Erhaltung der Genomstabilität. Sie gehören zur SF2-Familie der Helikasen, deren Aufbau in Kapitel 1.3 erläutert ist. Neben der konservierten Helikasedomäne besitzen sie zudem meist eine RecQ carboxyterminale (RQC) sowie eine *Helicase and RNase D* C-terminale (HRDC) Domäne. Einzellige Organismen besitzen üblicherweise eine RecQ-Helikase, wie RECQ in *E. coli* und SGS1 in *Saccharomyces cerevisiae*, während bei multizellulären Eukaryoten mehrere Vertreter vorkommen. Zu den bekanntesten der fünf menschlichen RecQ-Helikasen zählen BLM, WRN und RECQ4, deren Mutationen zu den Krankheiten Bloom Syndrom (BLM), Werner Syndrom (WRN) und Rothmund-Thomson Syndrom (RECQ4) führen, welche mit Krebsprädisposition, vorzeitige Alterung und chromosomaler Instabilität in Verbindung gebracht werden (Übersicht: Croteau *et al.*, 2014). In *Arabidopsis* konnten sieben RecQ-Helikasen identifiziert werden: *AtRECQ1*, 2, 3, 4A, 4B, 5 und *AtRECQSIM* (Hartung und Puchta, 2006). RecQ-Helikasen sind 3'-5'-Helikasen und Komponenten einer Vielzahl an Multienzymkomplexen. Bei Rekombinationsvorgängen wie der HR können RecQ-Helikasen in den frühen Schritten der Reparatur als Antirekombinasen wirken und sind in späteren Schritten an der Dissolution der HR-Strukturen beteiligt (Kapitel 1.1.3). Daher ist der Verlust von RecQ-Funktionen häufig mit Hyperrekombination verbunden

(Yamagata *et al.*, 1998). Zusätzlich ist BLM an der Regression blockierter Replikationsgabeln beteiligt (Bugreev *et al.*, 2007). Auch andere RecQ-Helikasen spielen eine Rolle an blockierten Replikationsgabeln (Übersicht: Chu und Hickson, 2009).

*RECQ4A* und *4B* sind in *Arabidopsis* durch Genduplikation entstanden und weisen fast 70 % Identität auf. Interessanterweise wirken sie in ihren Funktionen als Antagonisten: *recq4a*-Mutanten sind sensitiv gegenüber den Agenzien MMS und Cisplatin, zeigen erhöhte HR und *recq4a mus81* Doppelmутanten sind letal (Hartung *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu sind *Recq4b mus81* Doppelmутanten nicht letal und *recq4b*-Mutanten weisen keine Hypersensitivitäten gegenüber genotoxischen Agenzien auf. Zudem zeigen sie einen starken Rückgang in der HR und RECQ4B ist nicht an der Unterdrückung von Crossoverereignissen beteiligt. *AtRECQ4A* ist ein funktionelles Homolog von SGS1 aus Hefe und BLM im Menschen (Hartung *et al.*, 2007).

## MUS81

Wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, sind HJs und dHJs ein häufiges Rekombinationsintermediat von Prozessen der DNA-Reparatur durch HR. Auch bei der Antwort auf blockierte Rekombinationsgabeln entstehen HJs (Kapitel 1.1.4). Das Auflösen dieser Strukturen wird durch sogenannte HJ Resolvasen, also substratspezifische Endonukleasen, katalysiert. Bekannte HJ Resolvasen sind die bakteriellen RUVVC oder RUSA sowie die Proteine YEN1, SLX1 und MUS81 in Hefe und deren Homologe in anderen Eukaryoten. In Hefe wurde gezeigt, dass YEN1 und MUS81 überlappende Funktionen ausführen (Tay und Wu, 2010). MUS81 weist Homologien zu der XPF-Untereinheit der ERCC1-XPF Endonuklease auf und bildet in *Saccharomyces pombe* und dem Menschen einen heterodimeren Komplex mit EME1 (MMS4 in *S. cerevisiae*). MUS81 wird in *S. pombe*, und zu einem geringeren Anteil auch in *S. cerevisiae*, zur Ausbildung von meiotischen Crossoveren benötigt. Außerdem sind MUS81-defiziente menschliche Zelllinien und *mus81*-Mutanten in *S. pombe* hypersensitiv gegenüber Replikationsstress verursachenden Agenzien wie Hydroxyurea beim Menschen und MMS, UV und HU bei *S. pombe* (Chen *et al.*, 2001, Boddy *et al.*, 2000).

*Arabidopsis mus81*-Linien sind stark sensitiv gegenüber MMS, Cisplatin, HU, IR und MMC (Hartung *et al.*, 2006, Berchowitz *et al.*, 2007). Neben dem MUS81-Homolog konnten auch zwei EME1 (EME1A und EME1B) Homologe in *Arabidopsis* identifiziert werden, welche gemeinsam mit MUS81 an der Prozessierung von HJs beteiligt sind (Geuting *et al.*, 2009). Bei der Reparatur von Interstrang-Crosslinks im Zusammenhang mit blockierten Replikationsgabeln schneidet der MUS81-EME1-Komplex nahe des Crosslinks und fügt dadurch den zur weiteren Prozessierung nötigen DSB ein (Hanada *et al.*, 2006).

## RECQ4A und MUS81 in der DNA-Reparatur von *A. thaliana*

Durch Mutantanalysen zeigten Mannuß und Kollegen, dass *Arabidopsis* über mindestens drei unabhängige Wege zur Prozessierung von DNA Reparaturintermediaten nach Cisplatin-, MMS- und MMC-Behandlung verfügt, in denen jeweils eines der Proteine

RAD5A, RECQ4A und MUS81 eine kritische Rolle spielt (Mannuss *et al.*, 2010). Sie konnten zeigen, dass MUS81 und RAD5A ähnlich stark an der Reparatur von MMC, MMS und Cisplatin induzierten Schäden beteiligt sind, während RECQ4A bei der Reparatur von MMC induzierten Schäden nicht involviert zu sein schien. Neueste Untersuchungen zeigten jedoch, dass auch RECQ4A eine Rolle bei der Reparatur MMC-induzierter Schäden einnimmt (Dangel *et al.*, 2014). So weisen *mhf1 recq4a*- sowie *fancm recq4a*-Doppelmutantenlinien eine signifikante Hypersensitivität gegenüber MMC auf, während die jeweiligen Einzelmutanten nicht sensitiv reagieren. MHF1 bildet gemeinsam mit MHF2 einen Komplex aus, der in Abhängigkeit von DNA-Schäden mit FANCM interagiert und an der Rekrutierung anderer FA-Proteine beteiligt ist (Kapitel 1.1.4). Doppelmutanten von *recq4a* und *mus81* zeigen Entwicklungsstörungen und sterben innerhalb von zwei Wochen ab (Hartung *et al.*, 2006).

Neben RAD5A, RECQ4A und MUS81 ist auch die Transläsionspolymerase POL $\zeta$  an der Reparatur von Crosslinks und anderen DNA-Läsionen beteiligt (siehe Kapitel 1.2). Durch die Untersuchung von *rev3 rad5a* Doppelmutanten wurde gezeigt, dass REV3 und RAD5A im Bezug auf das alkylierende Agens MMS sowie auf UV-B-Strahlung, Cisplatin und MMC in alternativen Reparaturwegen arbeiten (Wang *et al.*, 2011). Der Zusammenhang von POL $\zeta$  mit den RECQ4A- und MUS81-vermittelten Reparaturwegen wurde bisher nicht untersucht und ist Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

### 1.1.6 Die Proteinkinasen ATM und ATR

Die Antwort auf genotoxischen Stress kann als Signaltransduktionskaskade gesehen werden, in welcher DNA-Läsionen als initiale Signale fungieren, die von Sensoren detektiert und an nachgestellte Faktoren weitergeleitet werden. Zu den am besten untersuchten Initiatoren der zellulären Stressantwort gehören *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) und *ATM- and Rad3-Related* (ATR). ATM und ATR gehören zu der *Phosphoinositide-3-Kinase-Related Protein Kinase* (PIKK) Superfamilie der Proteinkinasen. Sie werden durch DNA-Schäden aktiviert und phosphorylieren zahlreiche nachgestellte Komponenten der Schadensreparatur. Hierbei reagiert ATM primär auf DSBs, während ATR hauptsächlich durch UV-induzierte Schäden, einzelsträngige DNA-Abschnitte und blockierte Replikationsgabeln aktiviert wird (Shiloh, 2001, Flynn und Zou, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteinkinasen sowohl gemeinsam, als auch getrennt von einander Aufgaben ausführen. Neben ihrer Phosphorylierung von Reparaturfaktoren regulieren ATM und ATR auch Faktoren des Zellzyklus, um dessen Voranschreiten bei schweren DNA-Schäden zu verhindern. Genannt seien an dieser Stelle die beiden Proteinkinasen CHK1 und CHK2, welche fundamentale zelluläre Prozesse wie DNA-Replikation, Zellzyklusverlauf, Chromatinrestrukturierung und Apoptose regulieren und unter anderem durch ATM und ATR phosphoryliert werden (Bartek und Lukas, 2003). Matsuoka und Kollegen identifizierten im Jahr 2007 über 700 Proteine mit einem Konsensusmotiv für ATM- und ATR-vermittelte Phosphorylierung, welche als Antwort auf IR phosphoryliert werden. Viele Proteine tragen mehrere dieser Phosphorylierungsmotive (Matsuoka *et al.*, 2007). ATM und ATR werden durch ähnliche Mechanismen, jedoch durch unterschiedliche Faktoren

zu DNA-Schäden rekrutiert. ATM wird in menschlichen Zellen durch den MRE11-RAD50-NBS1 (MRN)-Komplex zu DSBs rekrutiert, während ATR durch *ATR-Interacting Protein* (ATRIP) an RPA-ummantelte ssDNA herangeführt wird (Falck *et al.*, 2005, Lee und Paull, 2007). Als Antwort auf durch IR verursachte DSBs arbeiten ATM und ATR im selben Signalweg, welcher zu der Phosphorylierung von CHK1 führt. Hierbei löst ATM bei Zellen in der S- oder G2-Phase des Zellzyklus an dem durch IR ausgelösten DSB die RPA-Filamentbildung um die ssDNA aus, welche zur Rekrutierung von ATR und Phosphorylierung von CHK1 führt. Zusammen mit aktiviertem CHK2 wird daraufhin ein Zellzyklusarrest eingeleitet, und der Schaden über HR repariert. Bei Zellen in der G1-Phase wird der Schaden durch NHEJ repariert (Jazayeri *et al.*, 2006).

ATR wird hauptsächlich durch einzelsträngige DNA-Abschnitte aktiviert, welche während der Prozessierung von DSBs oder kollabierten Replikationsgabeln entstehen. Wichtig für die Aktivierung ist das Zusammenspiel aus RPA-ummantelter ssDNA, welche an doppelsträngige DNA angrenzt (Übersicht: Cimprich und Cortez, 2008). Insgesamt kontrolliert ATR ein viel breiteres Spektrum an Reaktionen auf DNA-Schäden als ATM. Außerdem ist ATR im Gegensatz zu ATM für den Erhalt der genomischen Integrität während der S-Phase des Zellzyklus essentiell und unentbehrlich für das Überleben der Zelle. Beim Menschen wurde ATR-Defizienz mit der sehr seltenen, autosomal rezessiv vererbten Krankheit Seckel Syndrom in Verbindung gebracht, welche sich unter anderem durch extremen Zwergwuchs und geistige Behinderung charakterisiert (O'Driscoll *et al.*, 2003). Mäuse mit heterozygoten Mutationen in *ATR* erkranken häufiger an Krebs als WT-Mäuse, während homozygote Mutationen von *ATR* zu Embryoletalität führen (Brown und Baltimore, 2000).

Auch Pflanzen besitzen Orthologe zu ATM und ATR. *Arabidopsis atm*-Mutanten sind hypersensitiv gegenüber Gammastrahlung und MMS und weisen Störungen in der transkriptionellen Induktion von Reparaturgenen in Antwort auf Strahlung auf. Des Weiteren sind *atm*-Mutanten partiell steril, was auf eine ausgeprägte chromosomale Fragmentierung während der Meiose zurückzuführen ist (Garcia *et al.*, 2003). *Arabidopsis atr*-Mutanten weisen Hypersensitivitäten gegenüber HU, Aphidicolin, UV-B sowie Gammastrahlung auf. Im Gegensatz zu *atr*-Mutanten in Säugetieren sind *Arabidopsis atr*-Mutanten lebensfähig, fertil und besitzen unter Standardbedingungen keinen auffälligen Phänotyp (Culligan *et al.*, 2004).

## 1.2 Transläsionspolymerasen

Nicht alle DNA-Schäden werden rechtzeitig vor dem Eintreffen der Replikationsgabel repariert und können so zu einem Replikationsblock führen. Dies liegt häufig darin begründet, dass die replikative Polymerase nicht dazu imstande ist, verformte DNA-Stränge als Matrize zu verwenden. Spezielle Polymerasen, die sogenannten Transläsionspolymerasen (TLS-Polymerasen), können aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in einem Transläsionssynthese (TLS) genannten Vorgang die Replikation über solche Schäden hinwegführen und verhindern dadurch einen gefährlichen Kollaps der Replikationsgabel. Im Gegensatz zu replikativen Polymerasen besitzen TLS-Polymerasen keine Proofreading Exonuklease-Aktivität und synthetisieren DNA mit signifikant höherer Fehlerrate. Die

Synthese durch TLS-Polymerasen muss jedoch nicht grundsätzlich fehlerbehaftet sein. Einige Polymerasen sind auf bestimmte DNA-Läsionen spezialisiert, über welche sie präferenziell und, wenn auch selten, fehlerfrei replizieren. Beispielsweise ist  $POL_{\eta}$  darauf spezialisiert, über UV-induzierte CPD Thymindimere zu replizieren, indem sie im komplementären Strang akkurat zwei Adenine einfügt, während  $POL_{\iota}$  präferentiell Guanine statt Adenine gegenüber einem Thymin inseriert (Zhang *et al.*, 2000). Mutationen in  $POL_{\eta}$  führen beim Menschen zu einer Variante der Krankheit *Xeroderma pigmentosum* (XP-V), welche mit einer Überempfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung mit daraus resultierender Hautkrebsentwicklung einhergeht (Masutani *et al.*, 1999).

Polymerasen lassen sich anhand ihrer Aminosäuresequenzen und Kristallstrukturen in mindestens sechs verschiedene Familien einteilen: A, B, C, D, X und Y. Alle Polymerasen teilen die klassische rechte Hand-Struktur, die aus Handflächen-, Daumen- und Fingerdomänen besteht. Dabei sind die AS-Sequenzen der Finger- und Daumendomäne zwischen den verschiedenen Polymerasefamilien hoch variabel, während die Handflächendomänen große Ähnlichkeiten zwischen den Familien aufweisen. Diese beinhalten katalytischen Asparaginsäure-Reste (D), welche die für die Polymerisierungsreaktion notwendige Metallionenbindung vermitteln. Trotz der Unterschiede haben die verschiedenen Domänen analoge Funktionen: Die Handfläche enthält den größten Teil des aktiven Zentrums und ist für die Bindung des Primerendes und des  $\alpha$ -Phosphates des eintreffenden dNTPs zuständig. Die Daumen-Domäne interagiert mit dem Template-Primer-Komplex upstream der Synthesestelle und spielt eine Rolle in Prozessivität und Translokation des Proteins, während die Finger-Domäne wichtige Interaktionen mit dem eintreffenden dNTP, sowie der Template-Base vermittelt (Übersicht: Joyce und Steitz, 1995, Steitz, 1999). Der Katalysemechanismus unter Mitwirkung von zwei Metallionen (meist  $Mg^{2+}$ ), ist in allen Familien identisch.

TLS-Polymerasen konnten in allen drei Domänen des Lebens nachgewiesen werden, die meisten gehören der Y-Familie der DNA-Polymerasen an (Ohmori *et al.*, 2001). Dies ist eine Klasse von speziell strukturierten DNA-Polymerasen, welche zur Replikation über DNA-Schäden optimiert sind. Zusätzlich können andere Klassen von DNA-Polymerasen wie die Familien der A-, B- und X-Polymerasen TLS-Aktivität aufweisen, jedoch ist diese Aktivität häufig schwach oder nicht die Primärfunktion dieser Polymerasen. In Eukaryoten sind insgesamt 16 Polymerasen der Familien B, X und Y bekannt. *E. coli* besitzt drei auf die Replikation über Läsionen spezialisierte Polymerasen, während in Säugetieren zehn dieser Polymerasen bekannt sind (Goodman, 2002). Von ihnen sind  $POL_{\eta}$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$  und REV1 aus der Y-Familie der Polymerasen, sowie  $POL_{\zeta}$  aus der B-Familie am besten charakterisiert. Der strukturelle Aufbau der B-Polymerasen wird im Kontext von  $POL_{\zeta}$  im nächsten Kapitel genauer beschrieben. Auch TLS-Polymerasen verfügen über die typische rechte Hand-Faltung der replikativen Polymerasen, inbegriffen der Finger-, Daumen- und Handflächendomänen. Trotz dieser Gemeinsamkeiten zu replikativen Polymerasen besitzen TLS-Polymerasen strukturelle Besonderheiten, die ihnen die Fähigkeit zur Funktion in der TLS verleihen, jedoch auch ihre verringerte Replikationsgenauigkeit und damit potenziell mutagene Aktivität in der Zelle begründen. Bei den Y-Polymerasen konnte gezeigt



werden, dass Daumen- und Fingerdomänen im Vergleich zu denen replikativer Polymerasen ungewöhnlich klein sind. Dies führt zu einem weiter geöffneten und größeren aktiven Zentrum als bei replikativen Polymerasen und erlaubt den TLS-Polymerasen, deformierte Basenpaarungen und andere Läsionen in ihrem aktiven Zentrum aufzunehmen. Zusätzlich besitzen Y-Polymerasen eine einzigartige kleine Finger-Domäne, welche zusätzliche Kontakte zur DNA vermittelt und ihre katalytische Effizienz steigert (Yang, 2003).

Der Mechanismus zum Austausch der Polymerasen an der Replikationsgabel wird *Polymerase Switch* genannt. Die replikative Polymerase wird an der Läsion durch eine oder mehrere spezialisierte TLS-Polymerasen ausgetauscht, welche über den Schaden repliziert und anschließend wieder durch die replikative Polymerase ersetzt wird, die die Replikation fortführt. Oftmals werden für die Insertion von Nukleotiden gegenüber des Schadens und die weitere Extension des DNA-Stranges zwei verschiedene TLS-Polymerasen benötigt, sodass ein zweiter *Polymerase Switch* zwischen Insertion und Extension vollzogen wird. Dies ist darauf zurückzuführen, dass einige TLS-Polymerasen zwar sehr effizient gegenüber des Schadens Nukleotide einfügen, jedoch ineffizient in der darauf folgenden DNA-Extension sind, nach der die replikative Polymerase die Replikation wieder aufnimmt (Prakash und Prakash, 2002). Ein Beispiel hierfür stellt  $POL_{\eta}$  dar, welche nur direkt gegenüber Läsionen Nukleotide einfügen kann und danach eine zusätzliche TLS-Polymerase (meist  $POL_{\zeta}$ ) zur Extension benötigt. Generell wird für  $POL_{\zeta}$  die Extension der meisten TLS-Ereignisse postuliert. In Eukaryoten wird der *Polymerase Switch* durch posttranslationale Modifikationen des homotrimeren Ringklemmenproteins *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) vermittelt. Hierbei wird PCNA als Reaktion auf verschiedene DNA-Schäden durch einen Komplex aus RAD18 und RAD6, vermutlich an jedem seiner drei Monomere, an Lysin-164 monoubiquitiniert, was die Affinität für Polymerasen der Y-Familie an PCNA erhöht. Alle eukaryotischen Y-Polymerasen tragen Ubiquitin-Bindemotive oder ubiquitinbindende Zinkfingerdomänen, über die sie an monoubiquitiniertem PCNA binden können (Bienko *et al.*, 2005). Die Monoubiquitinierung kann durch das deubiquitierende Enzym *Ubiquitin-Specific Processing Protease 1* (USP1) aufgehoben werden. Andere Modifikationen von PCNA können hingegen andere Faktoren an die blockierte Replikationsgabel rekrutieren (Übersicht: Mailand *et al.*, 2013). Polyubiquitinierung durch die RAD5-Orthologe HTLF und SHPRH führt beispielsweise unter anderem zu der Rekrutierung der Annealing Helikase ZRANB3, auch AH2 genannt (Kapitel 1.3.2), welche zur Reversion der Replikationsgabel beiträgt und über *Template Switching* eine Wiederaufnahme der Replikation ermöglicht. TLS und *Template Switch* sind die beiden Zweige der PRR. TLS stellt hierbei den fehlerbehafteten Zweig und *Template Switch* den fehlerfreien Zweig der PRR dar (Kapitel 1.1.4).

$POL_{\eta}$ ,  $L$ ,  $\kappa$  sowie die REV7-Untereinheit von  $POL_{\zeta}$  (Kapitel 1.2.1) besitzen eine REV1-Interaktionsregion. REV1 ist das erste identifizierte Mitglied der Y-Polymerasen und ist die einzige Y-Polymerase mit einer N-terminalen *BRCA1 C-terminal* (BRCT) Domäne, über die sie direkt mit PCNA und DNA interagieren kann und welche eine spezifische Bindung an resektierte 5'-phosphorylierte Enden von DSBs vermittelt (de Groote *et al.*, 2011). REV1 fungiert als Deoxycytidyl Transferase, da sie ausschließlich Deoxycytidin

(dC) gegenüber einer Läsion einfügt (Lin *et al.*, 1999). Jedoch weist das Protein selbst nur eine geringe katalytische Aktivität auf, weswegen sie wahrscheinlich eher als Bindeplattform für andere TLS-Polymerasen die Mechanismen der TLS koordiniert. REV1 trägt eine C-terminale Region, über die sie an andere  $\gamma$ -Polymerasen und POL $\zeta$  binden kann. Auch zwei zusätzliche Ubiquitin Bindemotive (UBMs) vermitteln die Bindung von REV1 an monoubiquitiniertes PCNA, wodurch REV1 an DNA-Schäden rekrutiert werden kann.

Neben ihrer wichtigen Rolle in der TLS wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass TLS-Polymerasen auch an der HR beteiligt sind. So zeigen *pol $\eta$*  DT40-Zellen aus Hühnern im Vergleich zum Wildtyp einen signifikanten Rückgang bei der Immunoglobulin (Ig) Genkonversion und DSB-induzierter HR, welche durch Komplementation mit menschlichem POL $\eta$  aufgehoben werden kann (Kawamoto *et al.*, 2005). In Extrakten aus menschlichen POL $\eta$ -defizienten Zelllinien wurde eine massiv reduzierte *D-loop* Extension festgestellt. POL $\eta$  interagiert zudem mit der Rekombinase RAD51, welche in diesem Zusammenhang die *D-loop* Extension stimuliert. Daher wird für POL $\eta$  eine duale Rolle in TLS und der Reinitiierung der DNA-Synthese bei der HR postuliert (McIlwraith *et al.*, 2005). Moldovan *et al.*, 2010 konnten in HeLa-Zellen physikalische und funktionelle Interaktion der TLS-Polymerase POLN und Faktoren des FA-Reparaturweges und RAD51 nachweisen und zeigen, dass POLN für die effiziente HR benötigt wird. Durch aufgereinigte menschliche Proteine wurde gezeigt, dass neben der replikativen POL $\delta$  auch POL $\eta$  und POL $\kappa$  *D-loops* ausdehnen können (Sebesta *et al.*, 2013). Auch in Hefe bilden POL $\zeta$  und REV1 einen Komplex und lokalisieren gemeinsam an DSB-Loci. Des Weiteren ist REV3 in Hefe für Mutagenese während der DSB-Reparatur verantwortlich (Hirano und Sugimoto, 2006, Holbeck und Strathern, 1997). Ferner konnte in DT-40 Zellen gezeigt werden, dass POL $\zeta$  eine Rolle in der DSB-Reparatur von Vertebraten spielt und *rev3 rad54* Doppelmutanten nicht lebensfähig sind (Sonoda *et al.*, 2003). In *Drosophila melanogaster* konkurrieren TLS-Polymerasen bei der Initiierung der HR-Synthese direkt mit replikativen Polymerasen. Hierbei ist HR in POL $\zeta$ -defizienten Fliegen stärker gemindert als bei POL $\eta$ -defizienten Individuen (Kane *et al.*, 2012). Die Gesamtheit dieser Ergebnisse zeigt, dass mehrere TLS-Polymerasen in verschiedenen Organismen unterschiedlich stark an der HR beteiligt sind.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Präferenz für bestimmte TLS-Polymerasen an verschiedenen DNA-Schäden. Untersuchungen in Bezug auf TLS-Beteiligung an der Reparatur von Intrastrang-Crosslinks und Interstrang-Crosslinks in HeLa-Zellen zeigten, dass REV1 und POL $\zeta$  unabhängig von der Monoubiquitinierung von PCNA und POL $\eta$  an der Reparatur von Interstrang-Crosslinks beteiligt sind, während sowohl RAD18 und POL $\eta$ , als auch POL $\zeta$  und REV1 für die Reparatur von Cisplatin-induzierten Intrastrang-Crosslinks nötig sind (Hicks *et al.*, 2010).

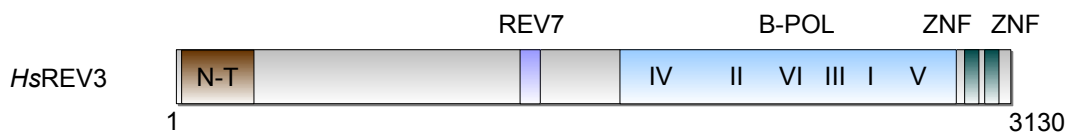
Da in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf die Funktion der Transläsionspolymerase POL $\zeta$  gelegt wurde, wird deren Aufbau und Funktion im nächsten Abschnitt näher beschrieben.

### 1.2.1 Die Transläsionspolymerase POL $\zeta$

POL $\zeta$  war bis 2012 als ein in Eukaryoten heterodimeres Protein aus den Untereinheiten REV7 und REV3 bekannt, wobei REV3 die katalytische Untereinheit des Proteins darstellt. REV7 stabilisiert und verstärkt die Polymeraseaktivität von REV3 um ein 20-30-faches, weswegen es als Prozessivitätsfaktor von POL $\zeta$  gesehen wird (Nelson *et al.*, 1996). Jedoch konnte gezeigt werden, dass POL $\zeta$  in *Saccharomyces* ein aus vier Untereinheiten bestehendes Enzym ist, das außer REV3 und REV7 noch die Untereinheiten POL31 und POL32 trägt, wobei REV3 durch ein Eisen-Schwefel-Cluster an seinem C-Terminus an POL31/POL32 bindet. Wird diese Bindefähigkeit durch Mutation in REV3 inaktiviert, kann POL $\zeta$  ihre Funktion in der TLS nicht mehr ausführen. POL31 und POL32 sind eigentlich akzessorische Untereinheiten der replikativen B-Polymerase POL $\delta$ , welche zudem noch aus der katalytischen Untereinheit POL3 besteht (Johnson *et al.*, 2012). Auch im Menschen wurde ein Komplex aus REV3, REV7, POLD2 und POLD3 beschrieben, wobei POLD2 und POLD3 Orthologe der Proteine POL31 und POL32 aus *Saccharomyces* darstellen und auch im Menschen Untereinheiten der replikativen POL $\delta$  sind. Ein Eisen-Schwefel-Cluster am C-Terminus von REV3 fungiert auch hier als Bindestelle für POLD2, an welches wiederum POLD3 bindet. Die POLD3 Untereinheit interagiert mit PCNA, wodurch die Prozessivität des Komplexes gesteigert werden könnte. Tatsächlich ist der REV3-REV7-POLD2-POLD3-Komplex viel effizienter und prozessiver in der Replikation über Cisplatin-induzierte Crosslinks als der REV3-REV7-Komplex (Lee *et al.*, 2014). Ein neues Modell des Polymerase Switches in *Saccharomyces* schlägt vor, dass POL31 und POL32 bei dem Auftreffen der Replikationsgabel auf eine DNA-Läsion an PCNA verbleiben und nur POL3 durch den REV3/REV7-Komplex ausgetauscht wird (Siebler *et al.*, 2014). Durch die Entdeckung der beiden zusätzlichen Untereinheiten von POL $\zeta$  wird für sie eine Vielzahl an potenzieller Bindungspartnern und eine Teilnahme an vielen verschiedenen biologischen Prozessen postuliert. In anderen Organismen ist bislang nichts über ähnliche Komplexe bekannt.

REV3 gehört der B-Familie der Polymerasen an, zu welcher auch alle replikativen DNA-Polymerasen der Eukaryoten gehören. Das Protein trägt drei zwischen Eukaryoten stark konservierte Regionen: Die N-terminale Region, die REV7-Bindedomäne, zwei Zinkfinger-motive sowie die Polymerasedomäne (Abbildung 1.5). Durch Sequenzvergleiche der Polymerasedomänen von verschiedenen B-Polymerasen konnten sechs Regionen (I - VI) mit hoher Identität identifiziert werden, wobei Region I am höchsten und Region VI am geringsten konserviert ist. Die Anordnung dieser Regionen ist dabei IV-II-VI-III-I-V und die Länge ihrer Abstände ist variabel (Wong *et al.*, 1988). Innerhalb der Regionen I, II und III liegen die Motive A (Region II), B (Region III) und C (Region I). Die Handflächen-Domäne umfasst die beiden Motive A und C, während die Fingerdomäne Motiv B zugeschrieben wird. Motiv A und C kommen in allen bekannten RNA- und DNA-Polymerasen vor und tragen jeweils einen katalytisch essenziellen Asparaginsäure-Rest zur Vermittlung der Metallionenbindung. Die Rolle von Motiv A ist zudem die Interaktion mit dem eintreffenden dNTP und dessen Koordination mit den zwei gebundenen divalenten Metallionen (Dong *et al.*, 1993, Shinkai *et al.*, 2001). Bei A-Polymerasen lautet die Konsensusse-

quenz von Motiv A „DYSQIELR“ und in der B-Familie „DxxxLYPS“. Die zwischen vielen prokaryotischen, eukaryotischen und viralen Polymerasen invariante Sequenz in Motiv C lautet „YGD TDS“, wobei durch Mutagenesestudien in *Herpes simplex*- und Adenoviren gezeigt wurde, dass nahezu alle Mutationen in dieser Sequenz drastische Auswirkungen auf die Polymeraseaktivität des Proteins haben (Dorsky und Crumpacker, 1990, Joung *et al.*, 1991). Motiv B, welches ein invariantes Lysin trägt, konnte in allen bekannten DNA-Polymerasen nachgewiesen werden.



**Abbildung 1.5: Domänenstruktur des menschlichen REV3-Proteins.** Abgebildet ist eine schematische Darstellung der Domänenstruktur von *HsREV3*. Die Polymerasedomäne (B-POL) enthält die klassischen sechs konservierten Regionen (I - VI). C-terminal der Polymerasedomäne liegen zwei Zinkfinger-Motive (ZNF). Zusätzlich befinden sich noch eine konservierte N-terminale Region (N-T) sowie eine REV7-Bindedomäne (REV7) innerhalb des Proteins.

Während REV3 in *S. cerevisiae* nicht essenziell ist, verursacht REV3-Defizienz in Mäusen Embryoletalität (Bemark *et al.*, 2000, Esposito *et al.*, 2000). Dies ist bei keiner anderen bisher untersuchten TLS-Polymerase der Fall. POL $\zeta$  ist im Vergleich zu anderen TLS-Polymerasen relativ effizient in der Extension nach fehlgepaarten Primerenden und katalysiert die potenziell mutagene Replikation über eine große Anzahl von DNA-Läsionen (Prakash *et al.*, 2005). POL $\zeta$ -defiziente Vertebraenzellen sind sensitiv gegenüber Cisplatin und MMC, was durch die Endonuklease-gekoppelte Reparatur von Interstrang-Crosslinks durch POL $\zeta$  und REV1 zu erklären ist (Sharma und Canman, 2012).

In *A. thaliana* konnten Homologe zu mehreren TLS-Polymerasen, unter anderem POL $\zeta$  identifiziert werden. *Atrev3*-Mutanten sind hypersensitiv gegenüber UV-B, Gammastrahlung, Cisplatin, MMS und MMC. Das 1890 AS lange Genprodukt verfügt über die konservierte N-terminale Region und die Polymerase- sowie Zinkfingerdomänen (Sakamoto *et al.*, 2003). *Atrev7* ist im Vergleich zu *Atrev3* nur schwach sensitiv gegenüber akuter UV-B und Gammastrahlung (Takahashi *et al.*, 2005). 2011 konnte gezeigt werden, dass *AtRAD5a* und *AtREV3*, wie in Hefe in zwei alternativen Wegen der DDT von *Arabidopsis* fungieren. *Atrad5a Atrev3* Doppelmutanten zeigten dabei im Vergleich zu den Einzelmutanten einen synergistischen Effekt gegenüber dem Replikationsblockaden verursachenden Agens MMS. Im Bezug auf die Sensitivität gegenüber den Crosslink verursachenden Agenzien Cisplatin und MMC zeigten die Doppelmutanten einen additiven Effekt (Wang *et al.*, 2011).

### 1.3 Helikasen und Annealing Helikasen

Entwindung von DNA und RNA-Strängen geschieht häufig während zahlreichen zellulären Prozessen wie DNA-Replikation, -Reparatur und -Transkription, Ribosomensynthese, RNA-Reifung und -Spleißung. Verantwortlich für diese Vorgänge sind Helikasen, welche

die dafür benötigte Energie aus der Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten (NTPs, meist ATP) beziehen. Ihre dabei vollzogene Translokation am Nukleinsäurestrang erfolgt mit direktonaler Spezifität, also in 5'-3'- oder 3'-5'-Orientierung. Ursprünglich wurden Helikasen als Nukleinsäure entwindende Proteine mit sieben konservierten klassischen Helikasemotiven I, Ia, II, III, IV, V und VI beschrieben (Gorbalenya *et al.*, 1988). Proteine, die diese Motive tragen, wurden anhand ihrer Domänenstruktur später in sechs Helikase Superfamilien eingeteilt, wobei nicht immer alle der sieben Motive vorhanden sein müssen. Innerhalb dieser Superfamilien haben allerdings nur einige der Proteine DNA entwindende Aktivität, da die Helikasemotive ein Charakteristikum aller Nukleinsäure abhängigen NTPasen ist, wovon nur eine Teilmenge Helikasen sind (Übersicht: Fairman-Williams *et al.*, 2010). So gehören beispielsweise auch Translokasen ohne DNA entwindende Aktivität in diese Familien, welche die Energie aus NTP nutzen, um sich direktonal entlang der DNA zu bewegen. Dadurch können beispielsweise größere Proteinkomplexe entlang der DNA transportiert werden. Ebenso sind auch Helikasen ohne Translokaseaktivität bekannt (Yang *et al.*, 2007).

Von den sieben klassischen Helikasemotiven sind nur zwei in allen Superfamilien existent: die Motive I und II. Bei Motiv I handelt es sich um das sogenannte Walker A Motiv, welches für die Koordination des  $\gamma$ -Phosphates während der ATP-Hydrolyse verantwortlich ist. Motiv II wird auch Walker B Motiv genannt und ist weniger stark konserviert als das Walker A Motiv. Es koordiniert die Bindung des essenziellen Cofaktors  $Mg^{2+}$  und aktiviert das zur Hydrolyse von ATP notwendige Wassermolekül. Die Anzahl der anderen Helikasemotive variiert zwischen den Superfamilien, zudem können zu den klassischen Helikasemotiven auch zusätzliche weitere Motive hinzukommen, um die Aktivität des Proteins zu definieren. Als weitere Funktion der klassischen Helikasemotive ist beispielsweise bei den Motiven Ia und IV in SF1 und SF2 die Bindung an Nukleinsäuren zu nennen (Übersicht: Caruthers und McKay, 2002).

Die Superfamilien der Helikasen und Translokasen lassen sich in zwei größere (SF1 und SF2) und vier kleinere Superfamilien (SF3 - SF6) unterteilen, wobei SF2 die größte aller Superfamilien ist. Die Mitglieder der SF1 und SF2 sind nah miteinander verwandt und teilen sich einen katalytische Domänen mit großer struktureller Ähnlichkeit, wobei das Level der strukturellen Konservierung innerhalb einer Superfamilie am höchsten ist (Singleton *et al.*, 2007). Der Helikasekern besteht aus zwei ähnlichen Domänen, welche eine ähnliche Faltung wie das Rekombinationsprotein RECA aus *E. coli* aufweisen. Innerhalb dieser zwei Domänen liegen die sieben klassischen Helikasemotive. Trotz ihrer großen Ähnlichkeit erfüllen die verschiedenen Proteine innerhalb dieser Superfamilien ein breites Spektrum an unterschiedlichen Funktionen an unterschiedlichen Substraten (Jankowsky und Fairman, 2007). Mitglieder der SF1 und SF2 arbeiten meist als Mono- beziehungsweise Dimere. Die anderen Superfamilien formen hexamere oder doppelt hexamere Ringe, welche aus 6 (oder 12) individuellen RecA-ähnlichen Domänen gebildet werden (Übersicht: Patel und Picha, 2000, Singleton *et al.*, 2007). Viele dieser hexameren Helikasen sind an der Entwindung der DNA an der Replikationsgabel beteiligt. Das ringförmige Umschließen der Nukleinsäure erhöht hierbei die Prozessivität der Proteine.

Zum Laden der Proteine auf das Template wird jedoch häufig ein ATP-abhängiger Faktor benötigt.

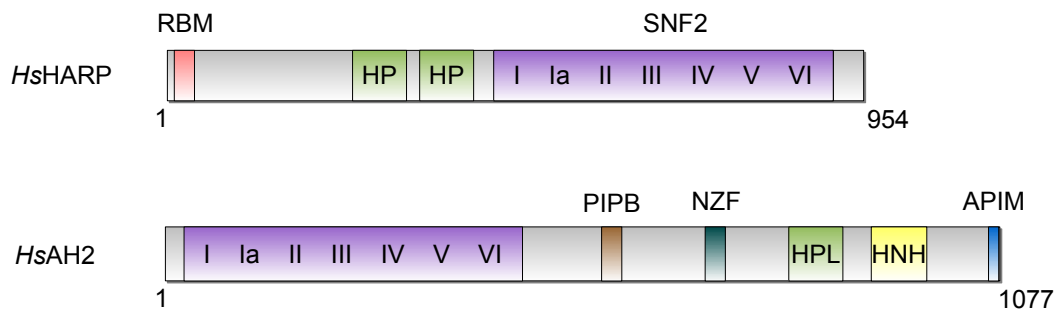
Nukleinsäure-Annealing-Aktivität wurde zuerst bei RNA-Helikasen festgestellt (Valdez *et al.*, 1997), konnte aber inzwischen auch einigen DNA-Helikasen zugeschrieben werden. So verfügt beispielsweise die RecQ-Helikase BLM neben ihrer Entwindungsaktivität über eine  $Mg^{2+}$  unabhängige Annealing-Aktivität, welche durch Einzelstrangbindeproteine sowie ATP inhibiert wird (Cheok *et al.*, 2005). Die Bezeichnung Annealing Helikase wurde gewählt, als im Jahr 2008 bei der menschlichen SMARCAL1 (*SWI/SNF2-Related, Matrix-Associated, Actin-Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily A-Like 1*), auch HARP (*HepA-Related Protein*) genannten Helikase keinerlei Entwindungsaktivität, sondern ATP-abhängige Annealing-Aktivität festgestellt wurde (Yusufzai und Kadonaga, 2008). Zwei Jahre später wurde die zweite Annealing Helikase, AH2 (Annealing Helikase 2), entdeckt (Yusufzai und Kadonaga, 2010).

HARP und AH2 sind Verwandte der *Sucrose Nonfermenting 2* (SNF2)-Familie von ATP-abhängigen molekularen Motorproteinen. Dies ist eine Untergruppe der SF2 der Helikasen, deren Mitglieder eine Ähnlichkeit zu dem namensgebenden Protein SNF2 aus *S. cerevisiae* aufweisen. Zu der SNF2-Familie gehört eine große Gruppe von ATP-hydrolysierenden Proteinen, welche in Eukaryoten zahlreich vertreten sind, aber auch in Eubakterien und Archaea vorkommen. Bisher konnten über 1300 Mitglieder katalogisiert werden, die in 24 Unterfamilien unterteilt wurden (Flaus *et al.*, 2006). Viele der ersten identifizierten SNF2 Mitglieder waren ATPasen innerhalb von Chromatin Remodeling Komplexen (Becker und Hörz, 2002). In *Arabidopsis* sind 41 Proteine der SNF2-Familie bekannt, wobei zwei dieser Proteine sich aufgrund einer vorhandenen Harp-Domäne in die SMARCAL1 Unterfamilie einteilen lassen: At1g48310 und At5g07810 (Knizewski *et al.*, 2008, Flaus *et al.*, 2006). At1g48310 ist auch unter dem Namen CHR18 bekannt und wird als Homolog von HsHARP gesehen. At5g07810 weist hingegen strukturelle Ähnlichkeiten zu HsAH2 auf. Die Funktionen dieser Proteine in *Arabidopsis* sind bisher unbekannt und Bestandteil der vorliegenden Arbeit, weswegen in den nächsten Unterkapiteln detaillierter auf HsHARP und HsAH2 eingegangen wird.

### 1.3.1 Die Annealing Helikase HARP

HsHARP ist ein Multidomänenprotein (Abbildung 1.6). Die C-terminale ATPase-Domäne ist, wie bei SF1 und SF2 Proteinen üblich, durch eine 115 AS lange Linkersequenz in zwei Regionen unterteilt. N-Terminal liegen eine hoch konservierte RPA-Bindedomäne sowie zwei Harp-Domänen, welche die Annealing-Aktivität des Proteins vermitteln (s.u.). Diese sind 55 AS lang und ebenfalls durch 40 AS voneinander getrennt. Weitere 47 AS von der C-terminalen Harp-Domäne liegt die ATPase-Domäne. Mutationen beim menschlichen HARP führen zu der seltenen, autosomal-rezessiv vererbten, pleiotropen Krankheit Schimke-immunooessäre Dysplasie (SIOD) (Boerkoel *et al.*, 2002). Es handelt sich dabei um eine Multisystemerkrankung, welche unter anderem mit disproportioniertem Kleinwuchs, faszialen Dysmorphien, T-Zell-Immundefizienz und Nierenbeschwerden verbunden wird (Spranger *et al.*, 1991). Bis heute wurden in der Literatur circa 50 Krankheitsfälle

weltweit beschrieben. HARP-defiziente Zellen zeigen ein vermehrtes Auftreten kollabierter Replikationsgabeln, S-Phase Zellzyklusarrest, Hypersensitivität gegenüber genotoxischen Agenzien und chromosomale Instabilität.



**Abbildung 1.6: Domänenstruktur der menschlichen Annealing Helikasen HARP und AH2.** Abgebildet ist eine schematische Darstellung der Domänenstrukturen von *HsHARP* und *HsAH2*. Beide Helikasen tragen die SNF2 Helikase-/ATPasedomäne, welche die sieben klassischen Helikasemotive umfasst und aufgrund der Übersichtlichkeit in der Abbildung nicht in zwei Regionen unterteilt wurde. *HsHARP* besitzt zudem eine N-terminale RPA-Bindedomäne (RBM) und zwei Harp-Domänen (HP). *HsAH2* trägt statt der doppelten Harp-Domäne eine dazu strukturell ähnliche Domäne (HPL), zwei zur Interaktion mit PCNA wichtige Domänen (PIPb und APIM), ein Zinkfingermotiv (NZF) und ein HNH-Motiv.

HARP bindet über seine RPA-Bindedomäne stabil an RPA, um komplementäre DNA-Einzelstränge zu verknüpfen. RPA ist ein heterotrimeres ssDNA-Bindeprotein, welches in Eukaryoten für eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur benötigt wird, während denen es ssDNA-Intermediate stabilisiert (Kapitel 1.1.3). Die RPA-Domäne ist nicht essentiell für die Annealing-Aktivität von HARP, jedoch für dessen Rekrutierung an DNA-Schäden. Dies wurde anhand von laserinduzierten DNA-Schäden gezeigt, welche hauptsächlich DSBs darstellen (Yusufzai *et al.*, 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass RPA an der Rekrutierung von HARP an gestresste oder angehaltene Replikationsgabeln beteiligt ist und HARP bei dem Erhalt der Stabilität von Replikationsgabeln benötigt wird (Yuan *et al.*, 2009). Wie viele an der Antwort auf Replikationsstress (Kapitel 1.1.4) beteiligte Proteine, wird HARP dabei durch die Protein-kinase ATR (Kapitel 1.1.6) phosphoryliert (Couch *et al.*, 2013). Der Verlust von HARP in menschlichen Zelllinien führt außerdem zu einer Hypersensitivität gegenüber den DNA schädigenden Agenzien CPT, MMC und IR (Ciccia *et al.*, 2009).

Durch Analysen von Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die beiden Harp-Domänen die Annealing-Aktivität von HARP durch direkte Interaktion mit der DNA vermitteln. In weiteren Studien wurden die beiden Harp-Domänen an die SNF2 Helikasedomäne eines weiteren Vertreters der SNF2-Unterfamilie fusioniert, der keinerlei Annealing-Aktivität besitzt. Dieses chimäre Protein zeigte eine mit HARP vergleichbare Annealing-Aktivität (Ghosal *et al.*, 2011). Neben der stabilisierenden Funktion an angehaltenen Replikationsgabeln kann HARP auch *Branch Migration* Reaktionen von HJs und Regressionen von Replikationsgabeln begünstigen. In Abwesenheit von HARP werden angehaltene Replikationsgabeln, vermutlich als Alternativweg zur Reparatur der Gabel, durch die Endonuklease MUS81-EME1 geschnitten (Bétous *et al.*, 2012). Mithilfe von Punkt-

mutationen innerhalb stark konservierter Aminosäuren und Deletionsmutanten der Harp-Domänen wurde gezeigt, dass nur die zweite Harp-Domäne essentiell für DNA-Bindung und Annealing-Aktivität ist. Die erste Harp-Domäne leistet hingegen nur einen geringen Beitrag zur DNA-Bindung und ATPase-Aktivitäten von HARP und ist entbehrlich für seine Annealing, *Branch Migration* und Gabel-Regression Funktionen (Bétous *et al.*, 2012). Es wird vermutet, dass die erste Harp-Domäne eine Rolle in der Substraterkennung und -spezifität des Proteins einnimmt (Mason *et al.*, 2014). HARP wurde im Menschen entdeckt und ist evolutionär auch bei Invertebraten konserviert, inbegriffen *C. elegans* und *D. melanogaster*. In Hefe konnten keine Orthologe identifiziert werden. Nur HARP Proteine in Vertebraten besitzen zwei Harp-Domänen, während Invertebraten nur eine einzelne Harp-Domäne tragen.

HARP ist demnach an der Stabilisierung von angehaltenen oder blockierten Replikationsgabeln beteiligt. Es ist eines der ATP-abhängigen Motorproteine, welche die Regression der Replikationsgabel katalysieren können und teilt sich diese Aufgaben vermutlich unter anderem mit BLM, WRN, FANCM und AH2.

### 1.3.2 Die Annealing Helikase AH2

Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen der SNF2 ATPase-Regionen von HARP und dem bis dahin uncharakterisierten Protein ZRANB3 (*Zinc Finger, RAN-Binding Domain Containing 3*), wurde dieses von Yusufzai und Kadonga (Yusufzai und Kadonaga, 2010) biochemisch untersucht. Da in biochemischen Analysen eine Annealing Helikase-Aktivität, jedoch keine Helikase-Aktivität für ZRANB3 nachgewiesen werden konnte, wurde es AH2 (Annealing Helikase 2) benannt.

HsAH2 besitzt statt der doppelten Harp-Domäne eine *HARP-Like Domain* (HPL), welche die Annealing-Aktivität des Proteins vermittelt (Yuan *et al.*, 2012). Abgesehen von der HPL und der SNF2 Helikasedomäne besitzen AH2 und HARP keine strukturellen Übereinstimmungen (siehe Abbildung 1.6). So fehlt AH2 im Vergleich zu HARP eine RPA-Bindedomäne und es interagiert nicht direkt mit RPA. Im Gegensatz zu HARP besitzt AH2 ein NHN-Motiv, welches gewöhnlicherweise in Bakterien und Pilzen gefunden wird und häufig mit einer Nuklease-Aktivität assoziiert ist. So tragen beispielsweise Homing Endonukleasen und Restriktionsendonukleasen ein HNH-Motiv. Homing Endonukleasen sind meist in offenen Leserahmen innerhalb von selbstspaltenden Introns oder Inteinen codiert. Sie gehören zu den sogenannten eigennützigen DNA-Elementen und können sequenzspezifisch DSBs in Allelen induzieren, in denen ihre codierende Sequenz nicht vorkommt. Durch die Reparatur über HR kann diese Sequenz dann in das Allel eingefügt werden (Stoddard, 2005). In Vertebraten ist AH2 das einzige bisher bekannte Protein mit HNH-Motiv. Aufgereinigtes AH2 zeigt zwar keine Nuklease-Aktivität, eine latente Nukleaseaktivität unter bestimmten Bedingungen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zudem trägt AH2 ein Zinkfinger-Motiv zwischen den Helikasedomänen und dem NHN-Motiv. Strukturelle und funktionale Unterschiede zwischen HARP und AH2 weisen auf unterschiedliche Funktionen in der Zelle hin (Yusufzai und Kadonaga, 2010). 2012 konnte gezeigt werden, dass AH2 über Polyubiquitinierung von PCNA an DNA-Schäden



geleitet wird und über zwei PCNA Interaktionsmotive verfügt. Hierbei handelt es sich um eine *PCNA-Interacting Protein Box* (PIP<sub>B</sub>), welche zwischen den Helikasedomänen und der HPL lokalisiert ist, sowie ein *AlkB Homolog 2 PCNA Interaction Motif* (APIM) am C-terminalen Ende des Proteins. Das Zinkfinger-Motiv bindet präferenziell an K63-gebundene Polyubiquitinketten und ist für eine effiziente Verbindung von AH2 und PCNA nach DNA-Schäden benötigt. Menschliche AH2-defiziente Zelllinien reagieren hypersensitiv auf die DNA-schädigenden Agenzien Camptothecin, Hydroxyurea und Cisplatin. Zellen mit verminderter Expression von *AH2* und *HARP* zeigen zudem eine additive Sensitivität gegenüber Camptothecin, was auf eine voneinander unabhängige Reaktion auf Camptothecin induzierte Schäden hinweist. Außerdem ist AH2 in der Lage, frühe *D-loop* Intermediate aufzulösen und Schwesterchromatidaustausch nach Replikationsstress zu unterbinden (Ciccio *et al.*, 2012a).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Seit der Entdeckung der Annealing Helikasen HARP und AH2 konnten den menschlichen Proteinen bereits eine Funktion an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie DNA-Reparatur und -Replikation nachgewiesen werden. Mutationen in *HsHARP* führen zu der seltenen vererbaren Multisystemerkrankung Schimke-immunooossäre Dysplasie, welche unter anderem mit Kleinwuchs, Nierenbeschwerden und T-Zell-Immundefizienz in Verbindung gebracht wird. In *Arabidopsis* wurden bislang keine Untersuchungen zu putativen Homologen der menschlichen Annealing Helikasen durchgeführt.

Auch für die Transläsionspolymerase POL $\zeta$  sind Funktionen in DNA-Replikation und -Reparatur in verschiedenen Organismen bekannt. Mutationen in ihrer katalytischen Untereinheit, REV3, führen in Vertebratenzellen zu Hypersensitivitäten gegenüber Cisplatin und MMC und verursachen in Mäusen Embryoletalität. REV3-Mutanten in *Arabidopsis* zeigen unter Standardbedingungen keine phänotypischen Auffälligkeiten, reagieren jedoch hypersensitiv gegenüber einer Reihe genotoxischer Agenzien.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten funktionelle Analysen putativer Homologe der menschlichen Annealing Helikasen HARP und AH2 sowie der TLS-Polymerase REV3 durchgeführt werden. Dies sollte bezüglich der Annealing Helikasen zunächst durch strukturelle Untersuchungen putativer Homologe geschehen. Anschließend sollten T-DNA-Insertionsmutanten dieser strukturellen Homologe hinsichtlich ihrer Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Genotoxinen untersucht werden. Mithilfe verschiedener Rekombinations-Reporterlinien sollte ferner die HR-Rate in den charakterisierten HARP-Insertionslinien analysiert werden.

Um die Funktionsweise von REV3 bei der Reaktion auf DNA-Schäden besser zu verstehen, sollten nach der Einführung von Punktmutationen an der Position hoch konservierter Aminosäuren des Proteins Sensitivitätstests durchgeführt werden. Weiterhin sollte anhand von Doppelmutantenanalysen mit Proteinen bereits bekannter Funktion in der DNA-Reparatur eine Einordnung von REV3 in die verschiedenen Reaktionswege auf DNA-Schäden geschehen.

---

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Organismen

##### Pflanzen

Die Versuche dieser Arbeit wurden mit gentechnisch veränderten *Arabidopsis*-Linien des Ökotypes Columbia (Col-0) durchgeführt. Die genutzten T-DNA Insertionsmutanten wurden über NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, <http://arabidopsis.info/>) bezogen und stammen aus der SALK- (Alonso *et al.*, 2003) bzw. GABI-Kat-Kollektion (Rosso *et al.*, 2003). In Tabelle 2.1 sind die verwendeten transgenen Pflanzenlinien der SALK- sowie GABI-Kat-Kollektion aufgeführt. Durch Kreuzungen (Kapitel 2.2.15) wurden verschiedene T-DNA-Insertionsmutanten zu Doppelmutanten kombiniert. Für Komplementationsstudien wurden in die Insertionsmutante *rev3-2*, sowie als Kontrolle in den Wildtyp, Komplementationskonstrukte eingebracht, welche in Kapitel (3.2.2) eingehend beschrieben sind.

**Tabelle 2.1: Verwendete T-DNA Insertionsmutanten.** Aufgeführt sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten T-DNA Einzelmutanten. Bei diesen handelt es sich um T-DNA-Insertionsmutanten der SALK- (Alonso *et al.*, 2003) oder GABI-Kat-Kollektion (Rosso *et al.*, 2003). In der Spalte „Charakterisierung“ ist die Quelle der ersten grundlegenden Charakterisierung der jeweiligen Mutante aufgeführt.

Genname	Locus	Mutanten- bezeichnung	Insertionslinie	Charakterisierung
<i>REV3</i>	At1g6750	<i>rev3-2</i>	SALK_029237	Sakamoto <i>et al.</i> , 2003
		<i>rev3-3</i>	SALK_067237	Sakamoto <i>et al.</i> , 2003
		<i>rev3-5</i>	SALK_126789	diese Arbeit
<i>HARP</i>	AT1g48310	<i>harp-2</i>	GABI_170B02	diese Arbeit
		<i>harp-4</i>	GABI_771D06	diese Arbeit
<i>AH2</i>	At5g07810	<i>ah2-3</i>	SALK_006334	diese Arbeit
		<i>ah2-4</i>	SALK_137595	diese Arbeit
<i>RECQ4A</i>	At1g10930	<i>recq4a-4</i>	GABI_203C07	Hartung <i>et al.</i> , 2007
<i>MUS81</i>	At4g30870	<i>mus81-1</i>	GABI_113F11	Hartung <i>et al.</i> , 2006
<i>ATR</i>	At5g40820	<i>atr-2</i>	SALK_032841	Culligan <i>et al.</i> , 2004

## Bakterien

Für die Vermehrung der transformierten Plasmide wurde der *Escherichia coli* Stamm NEB5 $\alpha$  (New England Biolabs, NEB; Katalog-Nr. C2989K) genutzt. Für die Transformation von *Arabidopsis* wurde *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101::pMP90 (Koncz *et al.*, 1984) verwendet.

### 2.1.2 Plasmide

Alle in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2 aufgeführt und im nächsten Abschnitt näher beschrieben.

**Tabelle 2.2: Plasmide.** Aufgeführt sind die während dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Plasmide für Komplementationsstudien. Als Ausgangsvektor für diese Plasmide diente stets der binäre Vektor pPZP221 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994), in dessen *Multiple cloning site* verschiedene Konstrukte eingefügt wurden. PM, Punktmutation.

Plasmid	Resistenz (Bakterium)	Resistenz (Pflanze)	Einkloniertes Konstrukt
pSK-26	Spectinomycin	Gentamycin	Wildtyp-Konstrukt <i>REV3</i>
pSK-27	Spectinomycin	Gentamycin	PM-Konstrukt <i>REV3</i> (Motiv C; D1549A)
pSK-28	Spectinomycin	Gentamycin	PM-Konstrukt <i>REV3</i> (Motiv A; D1385A)

Als Ursprungsvektor für alle klonierten Vektoren wurde der binäre Vektor pPZP221 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) genutzt. Dieser enthält ein zur Selektion von transformierten *E. coli* benötigtes Spectinomycin/Streptomycin-Resistenzgen (*aadA*) sowie eine *Multiple cloning site* (MCS). Die MCS wird von zur Agrobakterium-vermittelten Transformation von *Arabidopsis* benötigten Sequenzen Left Border (LB) und Right Border (RB) flankiert. LB und RB grenzen die T-DNA ab, welche in die Pflanze übertragen wird.

Nach Linearisierung des Ursprungsvektors mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* und *XmaI* wurde mittels In-Fusion-Klonierung (Kapitel 2.2.7) ein Wildtyp-Konstrukt aus cDNA und gDNA unter Kontrolle des natürlichen Promotors und Terminators des Gens eingefügt. Hierdurch entstand das Plasmid pSK-26. Für die Herstellung der Punktmutationen tragenden Konstrukte bezüglich *REV3* wurde das komplette Wildtyp-Konstrukt tragende Plasmid pSK-26 mittels Mutageneseprimern amplifiziert (Kapitel 2.2.4). Die hierdurch entstandenen Plasmide wurden pSK-27 sowie pSK-28 benannt. Eine detaillierte Übersicht der hergestellten Konstrukte befindet sich in Kapitel 3.2.2.

### 2.1.3 Enzyme

#### Polymerasen

Für PCR-basierte Genotypisierungen (Kapitel 2.2.4) wurden folgende Taq-Polymerasen verwendet:

- DreamTaq DNA Polymerase (ThermoScientific/Fermentas, St. Leon-Rot)
- Taq DNA Polymerase mit einer Amplifikationsgeschwindigkeit von ca. 1 kb/min (Herstellung am eigenen Lehrstuhl), 10 x Amplifikationspuffer: 160 mM Ammoniumsulfat, 670 mM Tris, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Tween 20, pH 8,8 mit HCl)

Für Klonierungen (Kapitel 2.2.4) wurde eine Polymerase mit 5'-3' Exonuklease-Funktion (Proofreading) eingesetzt:

- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland)

### Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen *SacI* und *XmaI* wurden für die Linearisierung des Ursprungsvektors pPZP221 verwendet (Kapitel 2.2.7). Zum Verdauen von methylierten (A<sup>m</sup>) Ursprungsvektoren bei der ortsgerichteten Mutagenese von Plasmiden (Kapitel 2.2.4) fand die Restriktionsendonuklease *DpnI* Verwendung. Alle Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma NEB bezogen und nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

- *DpnI* (5'-GA<sup>m</sup>TC-3')
- *SacI* (5'-GAGCTC-3')
- *XmaI* (5'-CCGGG-3')

### 2.1.4 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden von ortsüblichen Herstellern in *p.a.* Qualität bezogen und sind hier nicht aufgeführt.

Sonderchemikalien:

- Acetosyringon (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
- Agarose SeaKem LE (Lonza, Basel, Schweiz)
- Benzylaminopurin (BAP; Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Beef-Extrakt (GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg)
- DNA-Marker GeneRuler<sup>TM</sup> 1kb DNA-Leiter (Thermo Scientific/Fermentas Life Sciences GmbH, St. Leon-Rot)
- dNTP Set (ThermoScientific/Fermentas, St. Leon-Rot)
- Hefe-Extrakt (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Micro-Agar (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Murashige & Skoog Medium mit Vitaminen und MES-Puffer (MS-Medium; Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Natriumhypochlorit 12 % (Carl Roth, Karlsruhe)
- Pepton (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Plant Agar (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)

- Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, Texas, USA)
- Silwet Gold (Hermann Meyer KG, Rellingen)
- Trypton (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Tween 20 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid, Cyclohexylammoniumsalz (X-GlcA; Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)

### 2.1.5 Genotoxine

- Bleomycinsulfat (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- *cis*-Diamin-dichlorid-platin (II) (Cisplatin) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Hydroxyharnstoff (Hydroxyurea, HU) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Methylmethansulfonat (MMS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Mitomycin C (MMC) (Duchefa Biochemie B. V., Haarlem, Niederlande)
- Raltitrexed (RTX) (AK Scientific, Inc., Union City, Kalifornien, USA)

### 2.1.6 Medien

Alle Kulturmedien wurden nach der Herstellung durch Autoklavieren sterilisiert. Zugabe von Antibiotika (Tabelle 2.3) zur Selektion erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf circa 50 °C. Konzentrationen zugegebener Genotoxine für Sensitivitätstests und Rekombinationstests sind den jeweiligen Kapiteln 2.2.16 und 2.2.18 zu entnehmen. Das zur Transformation von *Arabidopsis* benötigte Infiltrationsmedium wurde für jede Transformation frisch hergestellt und daher nicht autoklaviert.

<b>Kulturmedium für <i>A. thaliana</i></b>	<b>GM-Medium</b>	
	Saccharose	10 g/l
	MS-Medium	4,9 g/l
	Plant-Agar (für Festmedien) pH 5,7 mit KOH	8 g/l
<b>Kulturmedium für <i>E. coli</i></b>	<b>LB-Medium</b>	
	Trypton	10 g/l
	Hefe-Extrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Plant-Agar (für Festmedien) pH 7,0 mit NaOH	17,5 g/l
<b>Kulturmedium für <i>A. tumefaciens</i></b>	<b>YEB-Medium</b>	
	Beef-Extrakt	5 g/l
	Hefe-Extrakt	1 g/l
	Pepton	5 g/l
	Saccharose	5 g/l
	MgSO <sub>4</sub>	493 mg/l
Plant-Agar (für Festmedien)	12 g/l	

<b>Zur Transformation von <i>Arabidopsis</i></b>	<b>Infiltrations-Medium</b>	
	MS-Medium	2,5 g/l
	Saccharose	50 g/l
	Benzylaminopurin	4,25 µl/l
	Acetosyringon (100 mg/ml)	1 ml/l
	Silwet L-77	500 µl/l
	pH 5,7 mit KOH	

**Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika.** Alle verwendeten Antibiotika wurden von der Firma Duchefa Biochemie B. V., (Haarlem, Niederlande) bezogen. Angegeben sind die Endkonzentrationen in den Medien zur Selektion verschiedener Organismen.

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Cefotaxim		500 mg/l	
Gentamycin	20 mg/l	75 mg/l	20 mg/l
Rifampicin			100 mg/l
Spectinomycin	100 mg/l		100 mg/l

### 2.1.7 Lösungen und Puffer

<b>Rekombinationstests: Histochemische Färbung</b>	<b>Phosphatpuffer (100 mM)</b>	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	17,8 g/l
	pH 7 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	
	<b>X-GlcA (1 %)</b>	
	X-GlcA	10 g/l
	DMF	1 l
	<b>Na-Azid (5 %)</b>	
	Na-Azid	50 g/l
	ddH <sub>2</sub> O	1 l
	<b>X-GlcA Färbelösung (1 l)</b>	
	100 mM Phosphatpuffer	930 ml
	1% X-GlcA-Lösung	50 ml
	5% Na-Azid-Lösung	20 ml
<b>DNA-Schnellpräparation</b>	<b>Shorty-Extraktionspuffer</b>	
	Tris	2 M
	LiCl	0,4 M
	EDTA	25 mM
	SDS	1 %
	pH 9,0 mit HCl	
	<b>TE-Puffer</b>	
	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH 8,0 mit HCl	

### 2.1.8 Oligonukleotide

Alle als Primer für PCR-basierte Genotypisierungen sowie Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion International (Martinsried) und In-

vitrogen (Darmstadt) bezogen. Diese wurden für die genannten Standardreaktionen in entsalzter Form bestellt. Für Klonierungen wurden HPLC-aufgereinigte Oligonukleotide der Firma Biomers (Ulm) verwendet. Die Bezeichnungen und zugehörigen Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide befinden sich im Anhang (Kapitel A) dieser Arbeit.

### 2.1.9 Verbrauchsmaterial und Kits

- DNA-Aufreinigung: innuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena, Jena)
- DNA-Aufreinigung: High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim)
- In-Fusion Klonierung: In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Clontech, Mountain View, USA)
- Plasmid-Präparation: Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- RNA-Extraktion: RNeasy Plant Mini Kit (50) (Quiagen GmbH, Hilden)
- cDNA-Synthese: Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot)
- RT-PCR: LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim)
- Konzentrationsbestimmung RNA-Extraktionen: Qubit RNA Broad Range Assay Kit (Invitrogen, Darmstadt)
- Konzentrationsbestimmung DNA-Extraktionen: Qubit dsDNA Broad Range Assay Kit (Invitrogen, Darmstadt)

### 2.1.10 Geräte

#### Binokulare

- Stemi DV4 (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen)
- SZB 300 (VWR International, Darmstadt)

#### Heizschränke, Heizblöcke, Schüttler und Inkubatoren

- Pflanzenanzuchtschrank CU-36L4 (Percival Scientific, Perry, USA)
- Inkubationsschüttler 3032 (GFL, Burgwedel)
- Inkubationsschüttler Certomat IS (B. Braun Biotech International, Melsungen)
- Thermoblock TDB-120 (lab4you, Berlin)
- Thermoblock Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
- Trockenschrank UE 500 (Mettler, Schwabach)

#### Reinraumbänke

- et130V Sicherheitswerkbank (Ehret, Emmendingen)
- Typ KVF (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen)
- Uniflow UVU 700 (UniEquip, Planegg)

### **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)

### **Zentrifugen**

- CM-70M.07 Schüttelzentrifuge (Neolab, Heidelberg)
- MiniSpin Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)
- Z 233 M-2 (Hermle Labortechnik, Wehningen)
- Z 383 K (Hermle Labortechnik, Wehningen)

### **Sonstige**

- Elektroporation: Capacitance Extender Plus (Bio-Rad Laboratories, München)
- Elektroporation: Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories, München)
- Elektroporation: Pulse Controller Plus (Bio-Rad Laboratories, München)
- Reinstwasser: Purelab classic Reinstwasseranlage (ELGA Labwater, Celle)
- Reinstwasser: TKA high purity water system (Thermo Electron LED GmbH, Niederlbert)
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren: Qubit Fluorometer (Life Technologies, Darmstadt)
- UV-Geldokumentationssystem (Peqlab, Erlangen)
- UV-Bestrahlungssystem: BIO-LINK BLX



### 2.1.11 Software und Datenbanken

- ApE Plasmid Editor (Wayne Davis, University of Utah, USA)
- BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)
- DNASTAR 5.03 Programmsammlung (Lasergene, Madison, USA): EditSeq, Map-Draw, MegAlign, PrimerSelect, SeqMan
- ImageJ Bildverarbeitungsprogramm (Wayne Rasband, National Institute of Health, Maryland, USA) mit SmartRoot (<http://www.uclouvain.be/en-smartroot>; Guillaume Lobet und Xavier Draye, Université catholique de Louvain, Belgien)
- LightCycler 480 Software (Roche, Mannheim)
- NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- SIGnAL - SALK Institute Genomic Analysis Laboratory T-DNA Express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>)
- TAIR - The *Arabidopsis* Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/>)

Der letzte Zugriff auf die aufgeführten Datenbanken und Online-Tools erfolgte am 23. Mai 2014.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA-Schnellpräparation aus Pflanzengewebe

Zur DNA-Schnellpräparation wurde ein Rosettenblatt einer mindestens zwei Wochen alten Pflanze in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Hilfe eines Plastikpistills homogenisiert. Anschließend wurden 600 µl Shortypuffer hinzugegeben und durch Invertieren gemischt. Durch Zentrifugation (12.100 g, 5 Minuten) wurden Zelltrümmer abgetrennt und anschließend 300 µl des Überstandes zu, bereits in frischen Reaktionsgefäßen vorgelegten, 300 µl Isopropanol überführt. Nach erneutem, sorgfältigen Mischen durch Invertieren erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt (12.100 g, 10 Minuten), nach welchem der Überstand verworfen und das DNA-Pellet einige Stunden bei Raumtemperatur getrocknet wurde. Anschließend wurden 100 µl TE-Puffer auf das Pellet gegeben und dieses bei 37 °C unter Schütteln darin gelöst. Die so präparierte DNA wurde direkt zur Genotypisierung mittels PCR eingesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.2.2 RNA-Extraktion aus Pflanzengewebe

RNA-Extraktion aus 12 - 14 Tage alten, in Pflanzen-Anzuchtschränken angezogenen, *Arabidopsis*-Keimlingen erfolgte mit dem RNeasy-Plant Mini Kit (Quiagen) nach Herstellerangaben. Hierfür wurden jeweils 15 Pflanzen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Zellaufschluss diente ein Plastik-Pastill, mit dem das gefrorene Pflanzenmaterial homogenisiert wurde. Der optionale DNase-Verdau wurde durchgeführt. Die gewonnene Gesamt-RNA der Zellen wurde für eine anschließende cDNA-Synthese als Template verwendet. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.3 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des RevertAid<sup>TM</sup> H Minus Strand cDNA Synthesis Kits der Firma Fermentas wurden die mRNA-Moleküle der aus der RNA-Extraktion gewonnenen Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden unspezifische Oligo(dT)-Primer eingesetzt, welche an dem PolyA-Schwanz, der bei der Synthese jeder mRNA an das 3'-Ende angefügt wird, binden. Für jede Reaktion wurden 5 µg RNA eingesetzt. Die so gewonnene cDNA diente als Template für Klonierungs-PCRs für die hergestellten Komplementationskonstrukte sowie zur Messung von Genexpression in *HARP* und *AH2*-Mutanten durch quantitative Realtime-PCR.

### 2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurden in dieser Arbeit für Genotypisierungen und Klonierungen durchgeführt. Für die Berechnung der Schmelztemperatur der verwendeten Primer wurde die Formel

$$T_m = 4 \cdot (\text{Anzahl G/C}) + 2 \cdot (\text{Anzahl A/T})$$

genutzt. Die Annealingtemperatur wurde dann 1 - 2 °C unter der berechneten Schmelztemperatur gewählt. Die Elongationszeit sowie die genaue Zusammensetzung des PCR-Ansatzes richtete sich nach den Herstellerangaben für die verwendeten DNA-Polymerasen.

#### Genotypisierung von *Arabidopsis* mittels PCR

Die Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien erfolgte über Standard-PCRs mit zwei verschiedenen Primerkombinationen. Dabei handelte es sich zum einen um eine T-DNA-spezifische Primerkombination und zum anderen um eine Kombination aus zwei genspezifischen Primern. Bei der T-DNA-spezifischen Primerkombination bindet ein Primer innerhalb der T-DNA, während der zugehörige Primer zwischen 0,5 kb und 1 kb davon entfernt in der natürlichen genomischen Sequenz bindet. Ein PCR-Produkt kommt demnach nur zustande, wenn sich die T-DNA im vorausgesagten Integrationsort befindet. Bei der Primerkombination aus genspezifischen Primern binden die Primer up- und downstream des T-DNA-Integrationsortes in der genomischen DNA. Aufgrund einer entsprechend kurz gewählten Amplifikationsdauer wird hier nur ein PCR-Produkt gebildet, wenn sich keine T-DNA im Integrationsort befindet. Für PCR-basierte Genotypisierungen wurden die DreamTaq Polymerase oder die institutseigene Taq-Polymerase eingesetzt (Kapitel 2.1.3), welche eine Amplifikationsgeschwindigkeit von ca. 1 kb/min besitzen. Das zugehörige Standardprotokoll ist Tabelle 2.4 zu entnehmen.

#### Klonierungs-PCRs

Zur Amplifikation von für Klonierungen benötigte DNA-Fragmente wie genomische Bereiche und cDNA-Fragmente für Komplementationen von *REV3* wurde die Phusion High-Fidelity Polymerase gewählt, welche über eine 3'-5' Exonukleasefunktion (Proofreading)

**Tabelle 2.4: Standardprotokoll für PCR-basierte Genotypisierungen.** Die Annealingtemperatur richtet sich nach den jeweiligen Sequenzen der verwendeten Primer und wurde 1 - 2 °C niedriger gewählt, als die berechnete Schmelztemperatur  $T_m$  (Kapitel Seite 38). Bei unterschiedlichen Schmelztemperaturen des Primerpaares wurde die jeweils niedrigere Schmelztemperatur als Richtwert gewählt. Die Amplifikation besteht aus den Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Durchläufe
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	20 s	35
Annealing	1-2 °C < $T_m$	20 s	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	2 min/kb	1

verfügt. Dadurch konnte die Einbaurate falscher Nukleotide minimiert und durch Sequenzierung (Kapitel 2.2.8) ausgeschlossen werden. Da diese Polymerase zudem über eine höhere Prozessivität und damit verbunden eine höhere Amplifikationsgeschwindigkeit als die für Standard-PCRs eingesetzte Taq-Polymerase besitzt (2 - 4 kb/min), wurden Elongationszeiten dementsprechend angepasst. Eine weitere Abweichung zum Standardprotokoll stellt die höhere benötigte Denaturierungstemperatur von 98 °C dar.

### Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmiden mittels PCR

Um Punktmutationen innerhalb des Wildtypkonstruktes für *REV3* einzufügen, wurde das Plasmid, welches das bereits vollständige Wildtypkonstrukt enthielt, mittels zueinander komplementären Mutageneseprimern durch die Phusion Polymerase vollständig amplifiziert. Die Mutageneseprimer wurden so konzipiert, dass der gewünschte Basenaustausch in ihrer Mitte liegt. Nach der Amplifikation wurde das Ursprungsplasmid im PCR-Ansatz mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut, eine *E. coli*-Transformation durchgeführt (Kapitel 2.2.9) und anschließend einige der auf Selektionsmedium gewachsenen Klone durch Sequenzierung auf die gewünschte Mutation überprüft.

### Kolonie-PCR

Zur Identifizierung von positiven Klonen eines Transformationsansatzes (Kapitel 2.2.9) wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Die Primer wurden hierbei so gewählt, dass einer der Primer in dem inserierten Fragment und der andere Primer in dem Rückgrat des Ursprungsvektors bindet. So konnte nur dann ein PCR-Produkt entstehen, wenn sich das Fragment innerhalb des Plasmids befand. Als Matrize diente die DNA aus *E. coli*-Zellen, welche direkt von dem Selektionsmedium aufgenommen wurden. Die initiale Denaturierungsdauer betrug 5 min, während ansonsten nach Standardprotokoll (Tabelle 2.4) mit DreamTaq Polymerase vorgegangen wurde.

### Kontrolle der cDNA-Qualität und Realtime-PCR

Sollte die cDNA (Kapitel 2.2.3) für qRT-PCRs eingesetzt werden, fand eine zusätzliche Qualitätskontrolle der cDNA-Proben statt. Hierfür wurde eine PCR mit  $\beta$ -Tubulin Haushaltsgen (At5g44340) spezifischen Primern durchgeführt. Diese Kontrolle diente dem

Nachweis, dass sich keine genomische DNA (gDNA) in den cDNA-Proben befand, da diese die Ergebnisse der qRT-PCR verfälschen würde. Die Primer für die Kontroll-PCR waren so gewählt, dass mindestens ein Intron zwischen den Exons lag, auf denen die Primer binden konnten. Somit wurde bei Amplifikation von gDNA ein größeres PCR-Produkt synthetisiert, als wenn ausschließlich die cDNA des Gens amplifiziert wurde. Dieser Größenunterschied war in einem Elektrophorese-Gel deutlich erkennbar.

Realtime-PCR wurde zur Quantifizierung der Expression der Gene *HARP* und *AH2* angewandt. Hierbei wurde die relative Expression der Gene in den T-DNA-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Als Matrize diente die durch reverse Transkription aus RNA-Proben gewonnene cDNA (Kapitel 2.2.2 und 2.2.3). Nach jedem PCR-Zyklus wurde die Emission (521 nm) des zugefügten Farbstoffes SYBR-Green I (SYBR Green I Master, Kapitel 2.1.9) in den Proben gemessen, wobei der SYBR-Green I-DNA-Komplex durch blaues Licht (490 nm) angeregt wurde. Da die Fluoreszenzemissions-Intensität direkt mit der Menge an doppelsträngiger DNA korreliert, lassen sich über diese Messungen Aussagen über die DNA-Konzentrationen in den Proben treffen. Zur Normalisierung wurde zudem für jede cDNA-Probe die Expression des Haushaltsgens *ACTIN2* (At3g18780) detektiert. Nach Beendigung der Amplifikationszyklen wurde eine Schmelzkurve erstellt, anhand derer sich sicherstellen ließ, dass ausschließlich eine Amplifikation spezifischer Produkte stattfand. Folgendes Standardprotokoll wurde für alle qRT-PCRs verwendet:

**Tabelle 2.5: Standardprotokoll für Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR.** Die Emission des DNA-inkalierenden Farbstoffes SYBR-Green I wurde nach jedem der 50 PCR-Zyklen gemessen.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Durchläufe
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	10 s	50
Annealing	56 °C	10 s	
Elongation	72 °C	20 s	
Aufzeichnung der Schmelzkurve	55 °C - 95 °C		1

### 2.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von für Klonierungen amplifizierten DNA-Fragmenten wurde das Aufreinigungskit der Firma Analytik Jena (Kapitel 2.1.9) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Statt des mitgelieferten Elutionspuffers wurde zur Elution der DNA von der Säule steriles ddH<sub>2</sub>O verwendet.

### 2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von isolierten DNA-Proben aus Plasmidpräparationen (Kapitel 2.2.10), PCR-Fragmente für Klonierungen (Kapitel 2.2.4) sowie RNA-Proben (Kapitel 2.2.2) erfolgte durch das Qubit Fluorometer. Hierbei wurden entweder das Qubit dsDNA-, oder das Qubit RNA Broad Range Assay Kit nach Herstellerangaben genutzt.

### 2.2.7 In-Fusion Klonierung

Das Einbringen von DNA-Fragmenten in den Ursprungsvektor pPZP221 für die Komplementationen von *REV3* erfolgte über das In-Fusion HD Cloning Kit der Firma Clontech (Kapitel 2.1.9) nach Herstellervorgaben. Der Ursprungsvektor wurde hierfür zunächst in einem Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* und *XmaI* linearisiert. Die Amplifikation der Fragmente erfolgte über Primer mit 15 bp langen Überhängen, welche homolog zu den Enden des benachbarten Fragments beziehungsweise des linearisierten Plasmids waren. Nach Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Plasmid und Fragmenten wurden diese im Verhältnis 2:1 gemischt und mit einer entsprechenden Menge des In-Fusion Enzyme HD Premixes versetzt. Das darin enthaltene Enzym verbindet die homologen Sequenzen zwischen den Fragmenten und dem Plasmid, wodurch die Fragmente in gewünschter Reihenfolge in dem Plasmid inseriert werden. Die Reaktion wurde 15 Minuten bei 50 °C inkubiert und anschließend wurden 8 µl des Reaktionsansatzes in 100 µl kompetenter *E. coli*-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.9). Nach Vorselektion mit Selektionsmedium wurden positive Klone mithilfe von Kolonie-PCR (Kapitel 2.2.4) und anschließender Sequenzierung identifiziert.

### 2.2.8 Sequenzierungen

Zur Sicherstellung einer fehlerfreien Klonierung beziehungsweise zur Identifizierung von Klonen mit gewünschten Punktmutationen wurden die Sequenzen der klonierten Konstrukte mittels Sequenzierung überprüft. Auch zur Insertionsortbestimmung von in dieser Arbeit charakterisierten Insertionsmutanten wurden Sequenzierungen herangezogen. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Nach Abschluss der Sequenzierungen wurden die Sequenzdaten von der Firmenwebsite heruntergeladen und mithilfe von Programmen der DNASTAR Programmsammlung und ApE (Kapitel 2.1.11) ausgewertet.

### 2.2.9 Transformation und Kultur von *E. coli*

Hitzekompetente, bei -80 °C gelagerte *E. coli*-Zellen des Stammes NEB5 $\alpha$  wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 - 10 µl zu 100 µl des Plasmids (beziehungsweise 8 µl des In-Fusion-Ansatzes, Kapitel 2.2.7) hinzugegeben und das Gemisch für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 Sekunden, 42 °C) wurden die Zellen erneut für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden 400 µl LB Medium hinzugegeben und die Ansätze 1 h bei 37 °C und 650 rpm schüttelnd inkubiert. Ausplattiert wurden je 100 µl eines Ansatzes auf mit dem Antibiotikum Spectinomycin (Tabelle 2.2) versehenem LB Festmedium. Die Inkubation der Agarplatte erfolgte über Nacht bei 37 °C. Durch den Selektionsmarker wurde eine Vermehrung nicht transformierter Zellen unterbunden. Durch Kolonie-PCR (Kapitel 2.2.4) identifizierte positive Klone wurden in 5 ml mit Spectinomycin versetztem LB Medium bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Aus dieser Übernachtskultur wurden die Zellen zur Plasmid-Isolierung (Kapitel 2.2.10) gewonnen.

### 2.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels des Plasmid Miniprep Kits I der Firma Peqlab (Kapitel 2.1.9) nach Herstellerangaben. Als Ausgangsmaterial dienten 4 ml einer Übernachtskultur (Kapitel 2.2.9). Eluiert wurde mit sterilem ddH<sub>2</sub>O.

### 2.2.11 Transformation und Kultur von *A. tumefaciens*

Die Transformation von *A. tumefaciens* erfolgte durch Elektroporation. Hierfür wurden elektrokompente Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend in eine ebenfalls auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) überführt. Nach Zugabe des Plasmids (2 µl der Plasmidpräparation (Kapitel 2.2.10) auf 100 µl Zellsuspension) erfolgte die Elektroporation (2,5 kV, 200 Ω, 5 ms). Daraufhin wurden auf Eis 500 µl YEB-Medium hinzugegeben und die Zellen 1 h bei 28 °C und 750 rpm inkubiert. Zur Selektion auf erfolgreich transformierte Zellen wurden 100 µl eines Ansatzes auf mit Rifampicin, Gentamycin und Spectinomycin versetztem YEB-Festmedium ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 28 °C.

### 2.2.12 Transformation und Linientablierung von *A. thaliana*

#### Agrobakterium-vermittelte Transformation

Die Agrobakterium-vermittelte stabile genetische Transformation von *A. thaliana* erfolgte mithilfe der *Floral Dip*-Methode (verändert nach Clough und Bent, 1998). Hierfür wurde zunächst eine Vorkultur aus den auf Selektionsmedium gewachsenen Kolonien der Elektroporation (Kapitel 2.2.11) angesetzt (20 ml), welche 12-16 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert wurde. Von dieser Vorkultur wurden anschließend 2 ml zum Ansetzen einer Hauptkultur (400 ml) eingesetzt. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte analog zur Vorkultur. Die Zellen der Hauptkultur wurden abzentrifugiert (15 min, 4200 g) und die Pellets in 800 ml Infiltrationsmedium aufgenommen. Bei den zu transformierenden Pflanzen wurden bereits vorhandene Schoten und geöffnete Blüten entfernt und die so präparierten Pflanzen bis zur Rosette für circa 30 Sekunden in das langsam auf einem Magnetrührer rührende Infiltrationsmedium getaucht. Anschließend wurden die Pflanzen horizontal in eine mit Papiertüchern ausgelegte und mit Leitungswasser angefeuchtete Kiste gelegt und unter Lichtausschluss bis zum nächsten Tag inkubiert. Am Folgetag wurden die Pflanzen mit Leitungswasser abgesprüht und bis zur Samenreife im Gewächshaus kultiviert.

#### Etablierung von homozygoten *single locus* Linien aus der Transformation

Für Sensitivitätstests der Komplementationslinien von *REV3* wurden aus jeder Transformation mehrere genetisch verschiedene Linien etabliert, deren T-DNA homozygot an nur einem Locus im Genom enthalten ist (homozygoten *single locus* Linien). In der T1-Generation wurden dazu durch Selektion mittels Gentamycin und Spectinomycin auf zusätzlich mit Cefotaxim versetztem GM Festmedium erfolgreich transformierte Pflanzen identifiziert. Die hierzu notwendige Samensterilisation sowie Anzucht unter sterilen Bedingungen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.13 beschrieben. Diese sogenannten Primärtransformanten wurden bis zur Samenreife im Gewächshaus kultiviert. Die daraus resultierende, segregierende T2-Generation wurde auf Selektionsmedium auf eine 3:1-Aufspaltung

untersucht. Nach Mendel spalten die Nachkommen einer T1-Generation, deren T-DNA in nur einem Locus inseriert ist, 1:2:1 (homozygot T-DNA tragend : hemizygot : homozygotes WT-Allel) auf. Das bedeutet, dass 75 % der auf Selektionsmedium ausgebrachten Pflanzen eine T-DNA entweder homozygot oder hemizygot tragen und daher wachsen können, während 25 % der Pflanzen keine T-DNA tragen und absterben. Für *single locus*-Analysen wurden jeweils 52 Pflanzen auf Selektionsmedium ausgebracht, die gewachsenen sowie abgestorbenen Pflanzen gezählt und das Verhältnis statistisch mithilfe des  $\chi^2$ -Tests mit einem kritischen Wert  $\chi^2_{(1,0.95)}$  ausgewertet. Von jeweils zehn der so erhaltenen *single locus* Linien wurden zehn Pflanzen im botanischen Garten bis zur Samenreife kultiviert und das Saatgut anschließend einzeln für jede Pflanze geerntet. In der T3-Generation erfolgte der Test auf Homozygotie. Hierfür wurde das Saatgut der *single locus* Linien auf Selektionsmedium ausgebracht. Von den erneut jeweils 52 ausgebrachten Samen sollten bei einer vorliegenden Homozygotie alle Pflanzen wachsen können. Hier wurden jeweils 20 Pflanzen vermehrt und gemeinsam geerntet. Das erhaltene Saatgut der T4-Generation wurde für Sensitivitätstests (Kapitel 2.2.16) eingesetzt.

### 2.2.13 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis*-Samen

Zur Oberflächensterilisation von *Arabidopsis*-Samen wurde zunächst die benötigte Menge Saatgut in 1,5 ml Reaktionsgefäße abgefüllt. Anschließend wurde 1 ml einer 6 %-igen, mit einem Tropfen Polysorbat-20 (Tween 20) versetzten Natrium-Hypochlorit-Lösung hinzugegeben und die Samen darin 5 Minuten schüttelnd inkubiert (Eppendorf Thermomixer compact, 1400 rpm). Die drei darauf folgenden Waschschriffe mit sterilem ddH<sub>2</sub>O wurden unter einer Reinraumbank durchgeführt. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Samen in einer sterilen 0,1 %-igen Agaroselösung aufgenommen. Die so behandelten Samen wurden über Nacht bei 4 °C einer Kältestratifikation unterzogen und konnten am nächsten Tag auf GM Festmedium ausgebracht werden.

### 2.2.14 Pflanzenanzucht und Samenlagerung

#### Anzucht im Pflanzenanzuchtschrank

Pflanzen für Rekombinations- oder Sensitivitätstests, sowie zur RNA-Extraktion, wurden unter sterilen Bedingungen auf GM Festmedium angezogen. Hierfür mussten die Samen zunächst oberflächensterilisiert und stratifiziert werden (Kapitel 2.2.13). Die Aufzucht erfolgte dann in einem Pflanzenanzuchtschrank bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16 h Licht (22 °C) und 8 h Dunkelheit (20 °C).

#### Anzucht im Pflanzen-Anzuchtsraum

Die Kultivierung von Pflanzen, deren Anzuchsbedingungen nicht reproduzierbar konstant sein mussten, wie beispielsweise für Segregationsanalysen oder Genotypisierungen, wurden im Pflanzen-Anzuchtsraum auf GM Festmedium angezogen. Hierfür mussten die Samen zunächst oberflächensterilisiert und stratifiziert werden (Kapitel 2.2.13). Die Temperatur betrug hier durchgehend etwa 24 °C, bei 16 h Belichtung und 8 h Dunkelheit.

### **Erdanzucht von *A. thaliana***

Pflanzen, die für Kreuzungen oder Vermehrungen vorgesehen waren, wurden unter unsterilen Bedingungen im S1-Gewächshaus auf Erds substrat (Mischung 1:1 aus Floraton 3 (Floragard) und Vermiculit Körnung 2-3 mm, deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH) kultiviert. Hierfür wurden die Samen in H<sub>2</sub>O über Nacht bei 4 °C stratifiziert. Die Lufttemperatur während der gesamten Kulturdauer betrug tags 24 °C und nachts 22 °C bei einer relativen Luftfeuchte von 50 - 60 %. Die Beleuchtung erfolgte für 16 h/Tag.

### **Samenlagerung**

Die Aufbewahrung der Samen erfolgte an einem dunklen, trockenen Ort bei Raumtemperatur.

#### **2.2.15 Kreuzung von *A. thaliana***

Um Doppelmutanten aus einzelnen T-DNA-Insertionsmutanten zu erzeugen, sowie zur Etablierung für Rekombinationstests benötigter Pflanzenlinien (Kapitel 2.2.18), wurden Kreuzungen von *Arabidopsis*-Pflanzen durchgeführt. Hierfür wurden circa vier Wochen alte Pflanzen verwendet. Bei den Pflanzen, welche als Mutterpflanzen dienen sollten, wurden bereits vorhandene Schoten und geöffnete Blüten sowie zu junge Knospen und nicht benötigte Blütenstände entfernt. Daraufhin wurden mit einer spitzen Pinzette bei den noch geschlossenen Blüten Kelch-, Kron- und Staubblätter entfernt, ohne dabei den Fruchtknoten zu verletzen. Anschließend wurden von einer Pflanze, deren Pollen verwendet werden sollte, vollständig entwickelte und geöffnete Blüten abgenommen und Pollen von den Staubblättern auf die Narbe des freigelegten Fruchtknotens abgestrichen. Die Pflanzen wurden bis zur Samenreife im Gewächshaus weiter kultiviert. Hierbei wurden mehrmals pro Woche neue Triebe der Pflanze zurückgeschnitten. Die nach circa zwei Wochen gereiften Samen wurden geerntet, bei 37 °C für zwei Tage getrocknet und konnten anschließend weiter verwendet werden. In der F<sub>2</sub>-Generation wurden durch PCR-basierte Genotypisierung (Kapitel 2.2.4) homozygote Pflanzen identifiziert und vermehrt.

#### **2.2.16 Sensitivitätstest mit genotoxischen Agenzien**

Um transgene Pflanzenlinien wie T-DNA enthaltende Einzel- und Doppelmutanten sowie Komplementationslinien auf ihre Sensitivitäten bezüglich verschiedener genotoxischer Agenzien zu untersuchen, wurden Sensitivitätstests durchgeführt. Hierfür wurden die Samen wie in Abschnitt 2.2.13 beschrieben oberflächensterilisiert, nach Kältestratifikation über Nacht auf GM Festmedium ausgebracht und für sieben Tage im Pflanzen-Anzuchtschrank inkubiert. Daraufhin wurden je zehn Keimlinge pro Well in sterile 6-Well-Plates mit 4 ml GM Flüssigmedium umgesetzt. Bei den Kontrollen, in die keine Genotoxinzugabe erfolgte, wurde direkt 5 ml GM vorgelegt. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Genotoxinzugabe: Pro Well wurde 1 ml Genotoxin-Stocklösung hinzugegeben, sodass sich verschiedene Genotoxin-Endkonzentrationen in den Wells befanden (Tabelle 2.6). Bei Verwendung des in DMSO gelösten Genotoxins Camptothecin wurde zu den Kontrollen ohne Genotoxinzugabe 15 µl DMSO zugegeben. Dies entsprach der DMSO-Menge, die



bei der höchsten Camptothecin-Konzentration zugegeben wurde. Nach weiteren 14 Tagen Inkubationsdauer im Pflanzenanzuchtschrank wurde das Frischgewicht der Pflanzen aus den einzelnen Wells bestimmt. Dazu wurde überschüssiges Flüssigmedium mithilfe von Papiertüchern entfernt und die Pflanzen mit einer Analysewaage gewogen. Jeder Sensitivitätstest erfolgte in mindestens drei voneinander unabhängigen biologischen Wiederholungen. Für die Auswertung wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet und in einem Säulendiagramm dargestellt.

**Tabelle 2.6: Genotoxinkonzentrationen der Sensitivitätstests.** Die Genotoxin-Endkonzentrationen beziehen sich auf jeweils 5 ml Gesamtvolumen eines Wells. Cisplatin, *cis*-Diamin-dichlorid-platin (II); MMC, Mitomycin C; MMS, Methylmethansulfonat.

Genotoxin	Lösungsmittel	Eingesetzte Endkonzentrationen	Einheit
Camptothecin	DMSO	50, 100, 200	nM
Cisplatin	ddH <sub>2</sub> O	5, 10	μM
Hydroxyurea	GM flüssig	0,5, 1, 2, 4	mM
MMC	ddH <sub>2</sub> O	2,5, 5, 10, 15, 20	μg/ml
MMS	ddH <sub>2</sub> O	40, 60, 80, 100	ppm

### 2.2.17 UV-B Bestrahlung von Wurzeln

Zum Testen von Pflanzen auf UV-B-Sensitivität wurden diese nach der Oberflächensterilisation und Stratifikation (Kapitel 2.2.13) auf quadratische, mit GM Festmedium gefüllte Petrischalen ausgebracht, diese mit Parafilm verschlossen und für drei Tage senkrecht aufgestellt im Pflanzenanzuchtschrank inkubiert. Pro Platte wurden dabei zwei verschiedene Pflanzenlinien in zwei Reihen ausgebracht. Am dritten Tag erfolgte die UV-B-Bestrahlung. Hierzu wurden die geöffneten Platten in das UV-Bestrahlungssystem BIO-LINK BLX gestellt und in verschiedenen Dosen (0, 5 und 7 kJ/m<sup>2</sup>) bei einer Wellenlänge von 312 nm bestrahlt. Dabei wurden je zwei Platten und somit vier Pflanzenlinien parallel bestrahlt, wobei jeweils eine WT-Linie mitgeführt wurde. Anschließend wurden die Platten erneut mit Parafilm verschlossen und mit Alufolie lichtundurchlässig umhüllt für einen Tag inkubiert, woraufhin die Alufolie entfernt wurde und die Platten senkrecht aufgestellt für sechs Tage im Pflanzenanzuchtschrank inkubiert wurden. Daraufhin wurden die Pflanzen vor einem dunklen Hintergrund fotografiert und die Wurzellängen der Hauptwurzeln mit dem Programm SmartRoot vermessen. Pro Linie und Platte wurden die Wurzellängen von je sechs Pflanzen bestimmt, das arithmetische Mittel mit Standardabweichung berechnet und das Ergebnis als Säulendiagramm dargestellt.

### 2.2.18 Rekombinationstests

Für Rekombinationstests wurden die zu untersuchenden T-DNA Insertionsmutanten zunächst in die Reporterlinien DU.GUS, IU.GUS, DGU.US (Orel *et al.*, 2003) und IC9 (Molnier *et al.*, 2004) sowie in die *I*-Scel exprimierende Linie #8 (Dukowic, 2009) eingekreuzt. Die Reporterlinien tragen ein Reporterkonstrukt mit zwei nicht funktionellen Fragmenten des für die  $\beta$ -Glucoronidase codierenden *GUS*-Gens, die über eine Linkersequenz voneinander getrennt sind. Entsteht ein DNA-Doppelstrangbruch zwischen den Fragmenten

des Konstruktes, kann er über HR repariert werden, wenn dafür homologe Bereiche innerhalb des Konstruktes genutzt werden. Da die GUS-Fragmente sich in den verschiedenen Reporterkonstrukten in ihrem Aufbau unterscheiden, können die *GUS*-Genfragmente je nach Konstrukt auf unterschiedliche Weise zu einem funktionellen Gen restauriert werden. Durch die histochemische Färbung mit einem künstlichen Substrat X-GlcA der  $\beta$ -Glucuronidase können Rekombinationsereignisse durch Blaufärbung der Zellen quantifizierbar gemacht werden.

Das DGU.US-Reporterkonstrukt dient dem Nachweis von SSA-Ereignissen. Es besteht aus einem in zwei Hälften unterteilten, nicht funktionalen GUS-Gen mit überlappenden Sequenzen des mittleren Teils (GU und US). Die beiden direkten Sequenzwiederholungen sind für die Reparatur mittels SSA-Mechanismus nötig. Die Linkersequenz, welche die beiden Hälften separiert, trägt zudem eine I-SceI-Schnittstelle, über die gezielt Doppelstrangbrüche eingefügt werden können. Mithilfe der Reporterkonstrukte IU.GUS und DU.GUS können Reparaturereignisse durch den SDSA-Mechanismus detektiert werden. Die beiden Konstrukte unterscheiden sich ausschließlich in der Orientierung des zur Reparatur benötigten homologen Sequenzbereiches (U). Die beiden *GUS*-Fragmente sind hier ebenfalls durch eine I-SceI-Schnittstelle tragende Linkersequenz getrennt, weisen jedoch im Unterschied zum DGU.US-Konstrukt keine Sequenzüberlappung auf. Mit dem DU.GUS-Konstrukt (U in direkter Orientierung) können nur interchromosomale Rekombinationsereignisse nachgewiesen werden, das IU.GUS-Konstrukt (U in inverser Orientierung) ermöglicht hingegen zusätzlich den Nachweis intrachromosomaler Rekombinationsereignisse. Durch das IC9-Konstrukt ist die Restauration des *GUS*-Gens nur durch Verwendung der homologen Sequenzen des Schwesterchromatids oder des homologen Chromosoms möglich. Die beiden *GUS*-Fragmente liegen hier in direkter Orientierung zueinander, wobei das N-terminale Fragment dem C-terminalen Fragment folgt. Durch Restauration des Gens über intrachromosomale HR würde ein zirkuläres DNA-Molekül entstehen, welches aus der chromosomalen DNA entfernt werden würde.

Nach Vermehrung durch Selbstung in der F1-Generation wurden in der segregierenden F2-Generation die Pflanzen identifiziert, welche homozygot das Reporterkonstrukt beziehungsweise die I-SceI-Expressionskassette tragen und zusätzlich entweder homozygote Insertionsmutanten oder homozygot für das entsprechende Wildtyp-Allel waren. Diese Pflanzen wurden erneut durch Selbstung vermehrt und identische Genotypen gemeinsam geerntet.

Zum Testen der Rekombinationsraten mittels Induktion durch genotoxische Agenzien (Bleomycin, MMC) wurde das Saatgut der F3-Generation eingesetzt. Hierfür wurden die Samen der zu untersuchenden Pflanzen zunächst oberflächensterilisiert (Kapitel 2.2.13) und anschließend auf GM Festmedium ausgebracht. Nach einwöchiger Inkubation im Pflanzenanzuchtschrank wurden die Keimlinge in Halbschalenplatten mit je 9 ml GM Flüssigmedium umgesetzt. Einen Tag darauf erfolgte die Genotoxinzugabe: 1 ml Mutagen-Stocklösung wurde hinzugegeben, sodass sich eine Genotoxin-Endkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  in den Ansätzen befand. Zu den Kontrollansätzen wurde 1 ml GM Flüssigmedium gegeben. Nach weiteren fünf Tagen Inkubation wurden die Pflanzen aus den Halbschalen in Kunststoffröhrchen (50 ml) überführt und mit 5-10 ml X-GlcA Färbelösung versetzt. An-

schließlich erfolgte eine zweitägige Inkubation bei 37 °C. Danach wurde die Färbelösung verworfen und mithilfe etwa der gleichen Menge 70 % vergälltem Ethanol für zwei Tage bei 60 °C wurden die Farbstoffe der Blattgewebe herausgelöst. Die Pflanzen wurden anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Die Auswertung der histochemischen Färbung konnte durch Auszählen der blauen Sektoren im Pflanzengewebe am Binokular erfolgen. Die Ergebnisse von mindestens drei biologisch unabhängigen Wiederholungen wurden mit ihren arithmetischen Mittelwerten und der Standardabweichung als Säulendiagramm graphisch dargestellt.

Um mithilfe von I-SceI gezielt spezifische Doppelstrangbrüche innerhalb der Reporterkonstrukte IU.GUS, DU.GUS sowie DGU.US zu erzeugen, waren weitere Kreuzungen nötig. Nach der Etablierung der homozygoten Linien im Reporterhintergrund und mit den I-SceI-Expressionskassetten wurden diese so miteinander gekreuzt, dass das aus den Kreuzungen resultierende Saatgut entweder die homozygote Insertionsmutante oder das entsprechende homozygote Wildtyp-Allel hemizygot sowohl die I-SceI-Expressionskassette als auch das Reporterkonstrukt trug. Für die Rekombinationstests wurde das Kreuzungsaatgut direkt auf mit Gentamycin versetztes GM Festmedium ausgebracht. Da bei den Kreuzungen stets die I-SceI exprimierende Linie als Vaterlinie genutzt wurde, welche eine Gentamycin Resistenzkassette trägt, konnte durch die Verwendung von gentamycinhaltigem Medium sichergestellt werden, dass das Saatgut nicht durch unbeabsichtigte Selbstung der Pflanzen entstand. Nach 14 Tagen Inkubation im Pflanzenanzuchtschrank erfolgte die Färbung und Auswertung analog zu den genotoxininduzierten Rekombinationstests.

---

## 3 Ergebnisse

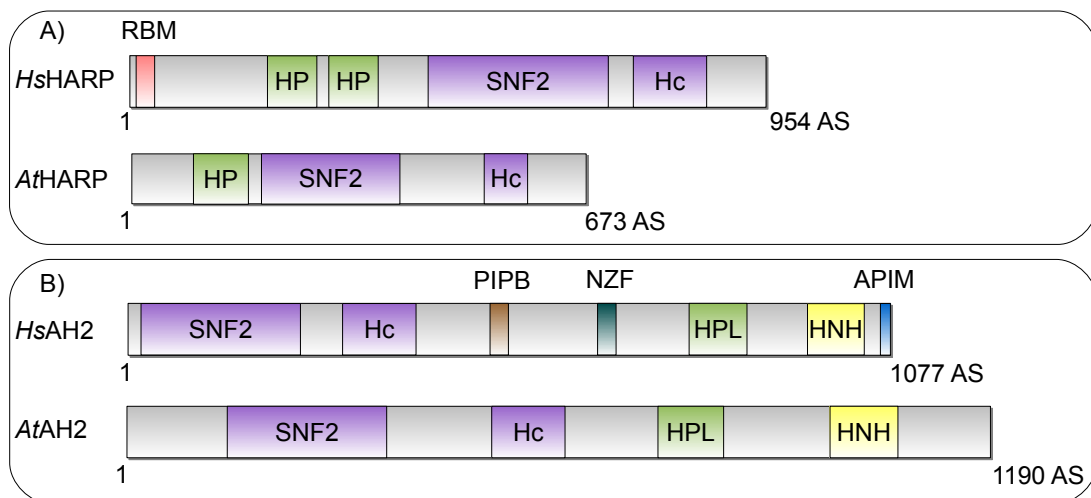
---

### 3.1 Untersuchungen zur Funktion von HARP und AH2 in *A. thaliana*

Die Annealing Helikasen HARP und AH2 gehören zu der SNF2-Familie der ATP-abhängigen molekularen Motorproteine. Zu den Aufgaben der Angehörigen dieser Familie gehört unter anderem die ATP-abhängige Umstrukturierung des Chromatins. Ihre Helikase-Domäne ist in zwei konservierte Regionen unterteilt: eine N-terminale SNF2-Region und eine C-terminale Helikase-Region. In Eukaryoten konnten über 1300 Proteine dieser Familie identifiziert werden (Flaus *et al.*, 2006). Diese SNF2-Proteine können anhand ihrer Domänenstruktur in 24 Unterfamilien eingeteilt werden, welche sechs größere Gruppen bilden: die SNF2-, SWR1-, RAD54-, RAD5/16-, SSO1653- und SMARCAL1-ähnliche Gruppe. In *Arabidopsis* sind 41 SNF2-Proteine bekannt, welche sich in 19 Unterfamilien einteilen lassen. Funktionelle Analysen zeigten, dass viele dieser SNF2-Proteine für die Entwicklung und Stressantwort benötigt werden. Einige von ihnen sind durch DNA-Methylierungsreaktionen an der epigenetischen Regulation beteiligt. Zwei der *Arabidopsis* SNF2-Proteine fallen in die SMARCAL1-ähnliche-Gruppe, die somit die kleinste der sechs Gruppen darstellt: die Expressionsprodukte von At1g48310 und At5g07810. At1g48310 codiert das 673 AS umfassende Protein *Chromatin Remodeling Factor 18* (CHR18). Neben der typisch für Proteine aus der SNF2-Familie aufgebauten Helikasedomäne trägt CHR18 eine N-terminale Harp-Domäne. At5g07810 codiert ein 1190 AS langes Protein, welches wie CHR18 eine Helikasedomäne besitzt. Zusätzlich trägt das Genprodukt von At5g07810 C-terminal eine putative HNH-Domäne.

In Publikationen betreffend HsHARP wird CHR18 aufgrund seiner Struktur als dessen Homolog aufgefasst (Ghosal *et al.*, 2011). Das Genprodukt von At5g07810 kann hingegen als Homolog der Annealing Helikase HsAH2 gesehen werden. Im Folgenden wird daher CHR18 als AtHARP und At5g07810 als AtAH2 bezeichnet. Ihr struktureller Aufbau im Vergleich zu ihren menschlichen Homologen ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Identität der HARP-Homologe beträgt 24,4%. Beide Proteine tragen C-terminal die typische Helikasedomäne aus zwei Untereinheiten, N-terminal davon trägt HsHARP zwei und AtHARP eine Harp-Domäne. Am äußersten N-terminalen Ende trägt das menschliche Homolog ein RPA Bindemotiv (RBM), welches in *Arabidopsis* nicht gefunden werden konnte (Ghosal *et al.*, 2011). Die AH2-Homologe weisen 23,6% Identität auf und tragen die SNF2-Helikasedomäne N-terminal. HsAH2 trägt statt einer Harp-Domäne eine *Harp Like Domain* (HPL). Um zu überprüfen, ob diese auch in *Arabidopsis* und anderen

Organismen vorhanden ist, wurden die Proteinsequenzen verschiedener Homologe mithilfe des Online-Tools Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) aligniert. Tatsächlich konnte in den untersuchten Homologen ein hoch konservierter Bereich identifiziert werden, welcher der HPL-Domäne von *HsAH2* entspricht (Abbildung 3.2). Die putative HPL-Domäne in *Arabidopsis* umfasst 114 AS und befindet sich zwischen den Positionen 804 und 918 des Proteins. Weiterhin tragen *HsAH2* und *AtAH2* eine C-terminale HNH-Domäne. Zusätzlich konnte für *HsAH2* eine Zinkfingerdomäne sowie zwei zur Interaktion mit PCNA wichtige Motive identifiziert werden: eine *PCNA Interacting Protein Box* (PIPB) sowie ein *AlkB Homolog 2 PCNA-Interaction Motif* (APIM) am C-Terminus. PIPB besteht aus der konservierten Konsensussequenz QxxL/I/MxxHF/DF/Y (Warbrick, 2000) und konnte ebenso wie das Zinkfingermotiv nicht in *Arabidopsis* nachgewiesen werden. Das APIM besteht aus einer kürzeren und variableren Konsensussequenz (K/R-F/Y/W-L/I/V/A-L/I/V/A-K/R, Gilljam *et al.*, 2009), welche bei *HsAH2* RFLVK lautet und in *AtAH2* nicht gefunden werden konnte.



**Abbildung 3.1: Vergleich der Domänenstrukturen von HARP und AH2 im Menschen und *Arabidopsis*.**

Abgebildet ist eine schematische Darstellung der Domänenstrukturen von HARP und AH2 im Menschen und *Arabidopsis*. Die Identität der HARP-Homologe aus *Arabidopsis* und dem Menschen beträgt 24,4%. Beide besitzen eine C-terminale Helikasedomäne, welche in die SNF2 und Helikase C-terminale (Hc) Regionen einteilen lässt. Menschliches HARP trägt zwei aufeinander folgende Harp-Domänen (HP), während HARP in *Arabidopsis* nur eine dieser Domänen trägt. Die N-terminale RPA Bindedomäne (RBM) konnte ebenfalls nur im menschlichen Protein identifiziert werden (A). Die AH2-Homologe aus *Arabidopsis* und dem Menschen weisen 23,6% Identität auf und tragen die SNF2-Helikasedomäne N-terminal. C-terminal tragen beide Homologe ein HNH-Motiv. Zwischen den Helikasedomänen und dem HNH-Motiv liegt bei dem menschlichen Protein eine zur Interaktion mit PCNA wichtige Domäne (PIPB), sowie ein Zinkfingermotiv (ZNF), gefolgt von einer *Harp Like Domain* (HPL). Am C-Terminus befindet sich ein ebenfalls zur Interaktion mit PCNA wichtiges Motiv (APIM). Auch bei *Arabidopsis* konnte eine HPL-Domäne identifiziert werden, eine PIPB, ein APIM und ein ZNF konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (B).

Um die Funktionen der HARP- und AH2-Homologe in *Arabidopsis* zu untersuchen, wurden T-DNA-Insertionslinien der betreffenden Gene bestellt und diese über PCR-basierte Genotypisierungen homozygot etabliert. Daraufhin wurden die Mutanten durch Insertionsortbestimmung der T-DNA und Expressionsanalysen der betroffenen Gene charakterisiert. Die Doppelmutanten und Einzelmutanten von *HARP* und *AH2* wurden dann Sen-



**Abbildung 3.2: Konservierung der HPL-Domäne in verschiedenen Organismen.** Sequenzvergleich der konservierten HPL-Domäne verschiedener Organismen: Mensch (*Homo sapiens*, Hs), Maus (*Mus musculus*, Mm), kleines Blasenmützenmoos (*Physcomitrella Patens*, Pp), Tomate (*Solanum lycopersicum*, Sl), Reis (*Oryza sativa*, Os) und *Arabidopsis thaliana* (At). Der schwarze Rahmen umgibt die im Menschen als HPL-Domäne identifizierte Sequenz und die dazu homologen Bereiche der anderen Organismen. Identische AS zwischen den Sequenzen mindestens drei verschiedener Organismen sind schwarz unterlegt, während einander ähnliche AS grau unterlegt sind.

sitivitätstests unterzogen, um eine mögliche Rolle in der DNA-Reparatur von *Arabidopsis* aufzuzeigen. Für *harp*-Mutanten wurden zudem Rekombinationstests durchgeführt, da der Annealing Helikase HARP im Menschen eine Rolle an Rekombinationsvorgängen zugeschrieben wird.

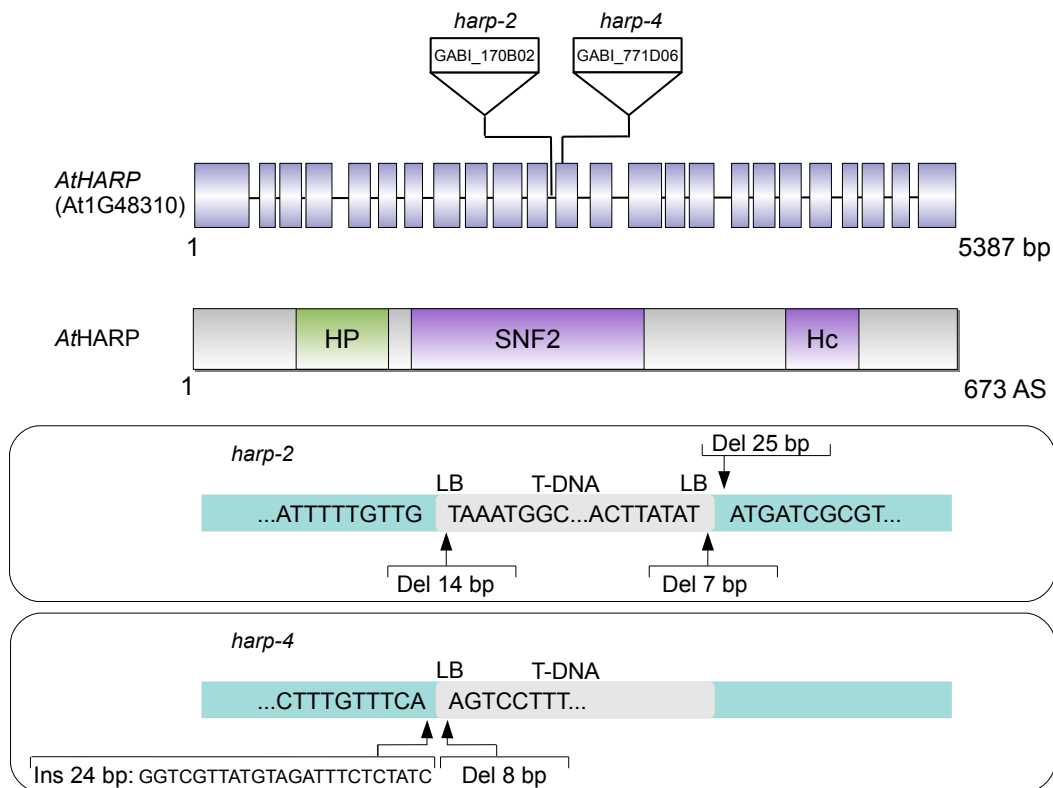
### 3.1.1 Charakterisierung von *harp*- und *ah2*-T-DNA Insertionsmutanten

Für funktionelle Analysen von HARP und AH2 wurden über NASC jeweils zwei T-DNA-Insertionsmutanten pro Locus bezogen. Mittels PCR-basierter Genotypisierungen wurden aus den erhaltenen segregierenden Linien homozygote Mutantenlinien etabliert. Anschließend konnten Insertionsortbestimmungen der T-DNAs sowie Expressionsanalysen der Mutantenlinien durchgeführt werden.

#### Insertionsortbestimmung

Die Insertionsbestimmung diente der Bestimmung des genauen Insertionsortes der T-DNA im Gen. Die T-DNA (abgegrenzt von RB und LB) wurde über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation in das Genom von *Arabidopsis* eingefügt. Die Insertionen erfolgen dabei ungerichtet und neben Mehrfachinsertionen an verschiedenen Stellen im Genom können diese auch innerhalb eines Locus auftreten. Mehrfachinsertionen innerhalb eines Locus können in verschiedener Orientierung (Kopf-an-Kopf und Kopf-an-Schwanz) vorliegen und sind nicht von Bedeutung für die getätigten Versuche der vorliegenden Arbeit. Weiterhin können durch die Insertion der T-DNA ins Pflanzengenom kürzere Deletionen und Insertionen direkt am Integrationsort entstehen. Zudem wurde gezeigt, dass es auch zu größeren Chromosomenumlagerungen wie Translokationen und Duplikationen kommen kann (Tax und Vernon, 2001, Clark und Krysan, 2010). Solche Duplika-

tionen und Translokationen können die Ergebnisse der durchgeführten Versuche verfälschen, weswegen die Insertionsortbestimmung der neu zu charakterisierenden T-DNA-Insertionsmutanten unumgänglich ist. Für die Insertionsortbestimmung wurden mittels PCR Fragmente mit einer Länge von circa 500 bp amplifiziert, die jeweils in 5'- und 3'-Richtung aus der LB oder RB der T-DNA in die genomische DNA reichen. Die Sequenzierung erfolgte dann anhand des jeweiligen verwendeten genomischen Primers, sodass die Bestimmung des Übergangs von genomischer DNA zu der T-DNA über Sequenzabgleich durchgeführt werden konnte. Die beiden T-DNAs der Insertionslinien *harp-2* (GABI\_170B02) und *harp-4* (GABI\_771D06) liegen unweit voneinander entfernt in der Mitte des Gens (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Aufbau des HARP-Gens und Insertionsortbestimmung der *harp* T-DNA-Mutanten.** *AtHARP* hat eine Länge von 5387 bp und ist in 24 Exons unterteilt. Die Integrationsorte der T-DNAs der Insertionslinien *harp-2* (GABI\_170B02) und *harp-4* (GABI\_771D06) sind im oberen Bildabschnitt gekennzeichnet. Die Linie *harp-2* trägt eine Mehrfachinsertion, welche an beiden Seiten mit einer LB abschließt. Bei der in 5'-Orientierung gelegenen LB entstand eine 14 bp umfassende und bei der in 3'-Orientierung gelegenen LB eine 7 bp umfassende Deletion der T-DNA. Zusätzlich wurden angrenzend zu der LB in 3'-Orientierung 25 bp der genomischen Sequenz von *HARP* deletiert. Der Insertionsort der Linie *harp-4* konnte nur am 5'-Ende sequenzgenau bestimmt werden. Dort befindet sich eine LB, welche um 8 bp verkürzt ist und von einer 24 bp langen Insertion zwischen trunkierter LB und genomischer DNA gefolgt ist.

Die T-DNA-Insertion der Linie *harp-2* befindet sich innerhalb des elften Introns zwischen den Exons elf und zwölf der insgesamt 24 Exons. Da sich auf beiden Seiten eine LB befindet, wurden mindestens zwei T-DNAs hintereinander inseriert. An beiden LB-Enden konnten Deletionen festgestellt werden. Bei der T-DNA in 5'-Richtung handelt es sich um eine 14 bp umfassende und bei der T-DNA in 3'-Richtung um eine 7 bp umfassende Deletion der LB. Zusätzlich zu diesen beiden Deletionen entstand auch eine 25 bp lange

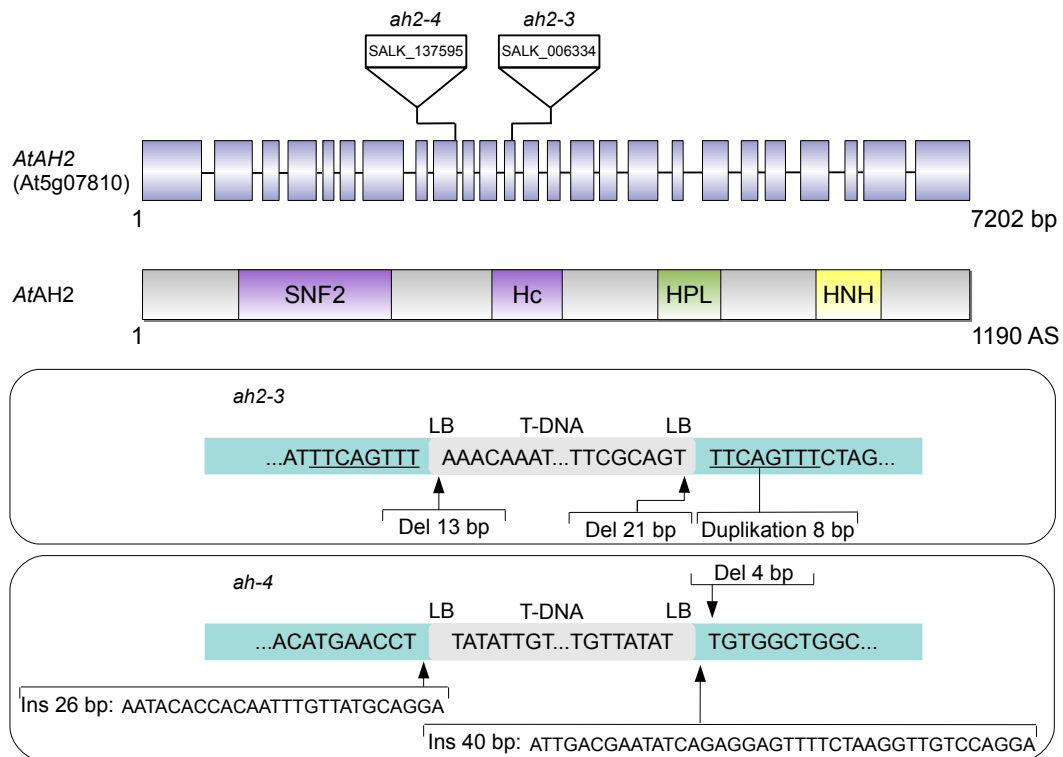
Deletion der genomischen DNA angrenzend der 5'-terminalen LB. Der Insertionsort ergibt sich dadurch zwischen den Positionen 2231 und 2251 bp bezogen auf das Start-Codon von *HARP*. Die T-DNA der Insertionslinie *harp-4* befindet sich in Exon zwölf. Hier liegt in 5'-Orientierung eine LB vor, welche um 8 bp deletiert wurde. Zusätzlich befindet sich dazu angrenzend eine 24 bp umfassende Insertion zwischen trunkierter LB und genomischer DNA (GGTCGTTATGTAGATTTCTCTATC). Der von der LB ausgehende Insertionsort befindet sich an Position 2442 bp des Gens bezogen auf das Start-Codon von *HARP*. Auf der anderen Seite der Insertion konnte weder eine LB noch eine RB durch PCR-Analysen gefunden werden.

Auch die Insertionen der Linien *ah2-3* (SALK\_006334) und *ah2-4* (SALK\_137595) liegen mittig im Gen (Abbildung 3.4). Die T-DNA der Linie *ah2-3* liegt in Exon zwölf und die der Linie *ah2-4* an der Exon/Intron-Grenze am 3'-Ende von Exon neun der insgesamt 25 Exons. Bei beiden Insertionslinien befinden sich randständig LB-Sequenzen, weswegen auch hier von mindestens zwei aufeinander folgenden T-DNAs am Insertionsort auszugehen ist. Bei der Linie *ah2-3* entstanden an beiden an die genomische DNA angrenzenden LBs Deletionen. Bei der 5' gelegenen LB umfasst diese 13 bp und bei der 3' gelegenen LB 21 bp. Zusätzlich erfolgte eine Duplikation der Sequenz TTCAGTTT, welche sich daher in 5'- und 3'-Richtung der T-DNAs befindet. Der Insertionsort befindet sich zwischen den Positionen 3700 - 3770 bp genomischer DNA des Gens *AH2* ab dem Start-Codon. Bei der in 5'-Richtung liegenden LB der Insertionslinie *ah2-4* entstand eine 26 bp umfassende Insertion zwischen LB und genomischer DNA (AATACACCACAATTTGTTATGCAGGA). Auch angrenzend der in 3'-Richtung liegenden LB befindet sich eine Insertion. Diese umfasst 40 bp (ATTGACGAATATCAGAGGAGTTTTCTAAGGTTGTCCAGGA) und ist gefolgt von einer 4 bp langen Deletion (GGTA) der genomischen DNA. Der Insertionsort liegt somit zwischen 3001 und 3007 bp der ursprünglichen Sequenz bezogen auf das Start-Codon von *AH2*.

### Expressionsanalysen

Mithilfe von Expressionsanalysen wurde der Einfluss der T-DNA-Insertionen auf die Expression der betroffenen Gene überprüft. Dies ist notwendig, da beispielsweise durch Spleißen Intron-Insertionen mit dem Intron entfernt werden können und das Gen daher trotz T-DNA-Insertion unbeeinflusst exprimiert werden könnte. Die Expression der Gene wurde mittels qRT-PCR in einem in 5'-Richtung der Insertion gelegenen Bereich, über die Insertion und im Bereich in 3'-Richtung der T-DNA-Insertion gemessen. Dafür wurde die gesamt-RNA der Mutantenlinien und des Wildtyps Col-0 extrahiert, von welcher bei der cDNA-Synthese mit Oligo(dT)-Primern für alle Proben die gleiche Menge eingesetzt wurde. Die Expressionen wurden auf das ebenfalls bei der qRT-PCR eingesetzte Haushaltsgen *ACTIN2* normalisiert. Die durch die Primerkombinationen A (im Gen in 5'-Richtung der T-DNA), B (die T-DNA überspannend) und C (im Gen in 3'-Richtung der T-DNA) entstehenden Amplifikate haben im Wildtyp eine Länge von circa 200 bp. Bei dem T-DNA überspannenden Primerpaar sollte bei der entsprechenden Insertionslinie kein Produkt entstehen können, da die Amplifikationsdauer so kurz gewählt wurde, dass die komplette Amplifikation der T-DNA nicht möglich ist. Bei durch Spleißvorgänge entfernten



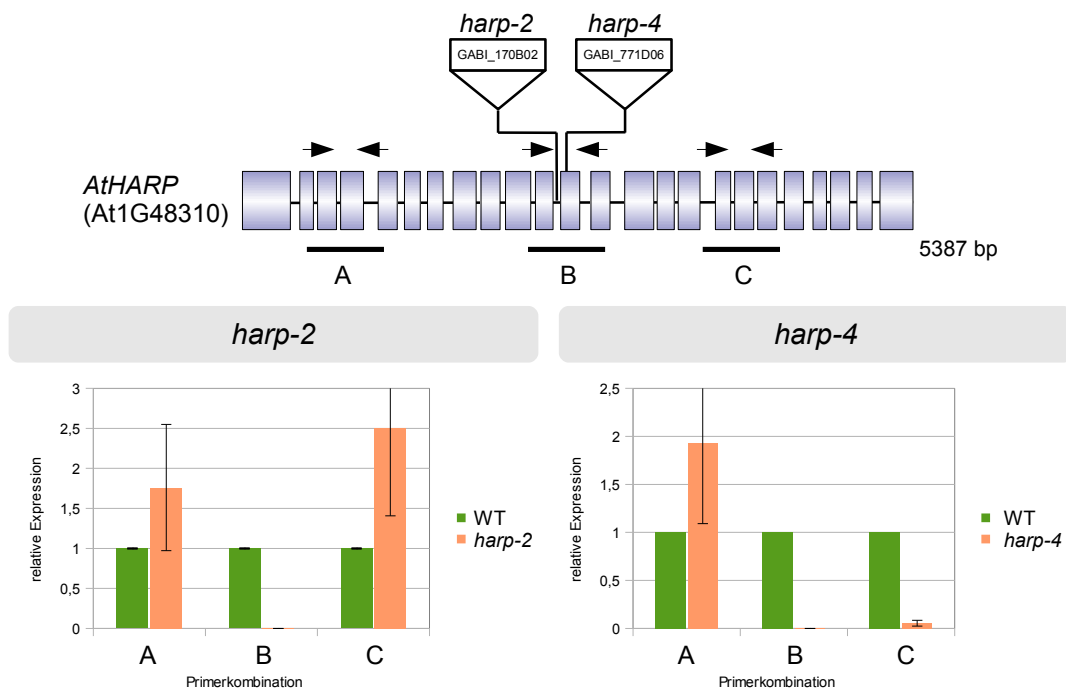


**Abbildung 3.4: Aufbau des *AH2*-Gens und Insertionsortbestimmung der *ah2* T-DNA-Mutanten.** *AH2* hat eine Länge von 7202 bp und ist in 25 Exons unterteilt. Die Integrationsorte der T-DNAs der Insertionslinien *ah2-3* (SALK\_006334) und *ah2-4* (SALK\_137595) sind im oberen Bildabschnitt gekennzeichnet. Bei beiden Linien liegen Mehrfachinsertionen der T-DNAs vor, die an beiden Seiten mit einer LB abschließen. Die endständigen LBs der Linie *ah2-3* sind um 13 beziehungsweise 21 bp verkürzt. Zudem entstand eine 8 bp umfassende Duplikation genomischer DNA (unterstrichene Nukleotide) angrenzend zum Insertionsort der T-DNAs. Bei der Linie *ah2-4* entstanden an beiden Seiten Insertionen zwischen LB und angrenzender genomischer DNA, welche an der 5'-Seite 26 bp und an der 3'-Seite 40 bp umfasst. Zusätzlich wurden am 3'-Ende nach der Insertion 4 bp genomischer DNA deletiert.

Insertionen würde hingegen ein Produkt entstehen. Aufgrund der räumlichen Nähe der Insertionen der beiden Linien konnten für beide Insertionslinien die gleiche Primerkombination B eingesetzt werden.

Die Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalyse der *harp*-Insertionslinien sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Bei beiden Insertionslinien ließ sich eine gesteigerte Expression des Genabschnittes in 5'-Richtung der T-DNA im Vergleich zum Wildtyp feststellen (176 % beziehungsweise 193 %). Mit dem die Insertion überspannenden Primerpaar wurde bei beiden Insertionslinien nahezu keine Expression (0,033 % beziehungsweise 0,021 %) im Vergleich zum Wildtyp gemessen. Bei der *harp-2*-Insertionslinie findet in 3'-Richtung der T-DNA eine zum Wildtyp gesteigerte Genexpression statt (250,4 %), wohingegen bei der *harp-4*-Insertionslinie nur eine geringe Expression (5,4 %) im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden konnte. Da bei der *harp-2*-Insertionslinie mit dem T-DNA überspannenden Primerpaar keine Expression über die T-DNA gemessen wurde, wurde diese nicht durch Spleißvorgänge aus der mRNA entfernt. Die erhöhte Expression in 5'- und 3'-Richtung der Insertionsstelle deutet darauf hin, dass das Protein trotz T-DNA-Insertion gebildet werden kann. Jedoch würden die Genfragmente bei der Translation wahrscheinlich zu keinem funktionsfähigen Protein führen. Im Fall der *harp-4*-Insertionslinie zeigt die

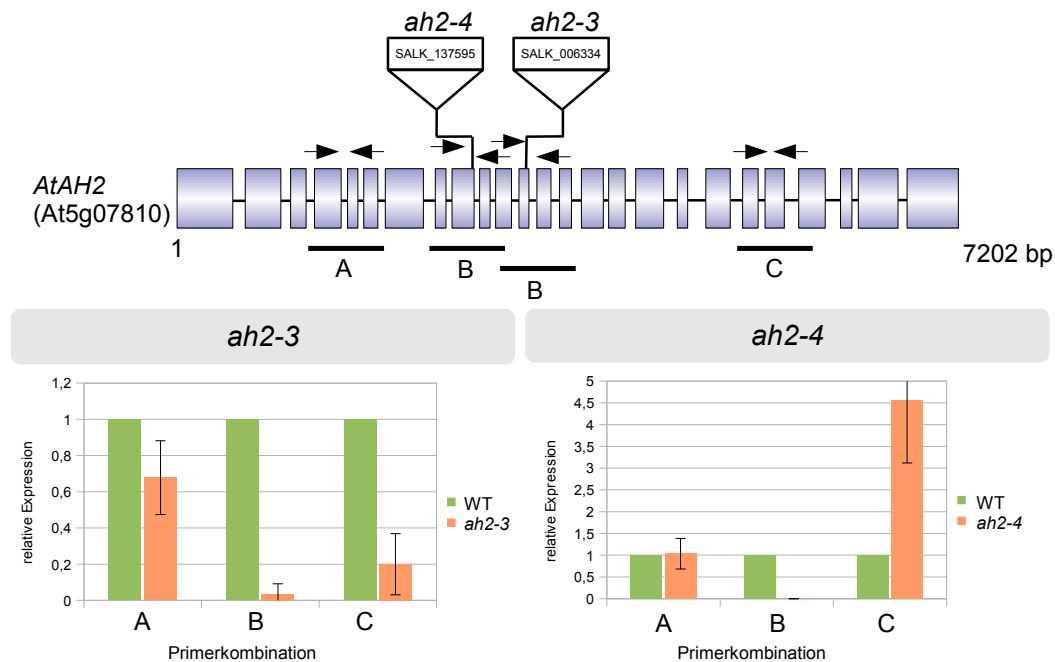
geringe Expressionsrate in 3'-Richtung der Insertion, dass auch hier Restprotein gebildet werden könnte. Jedoch würde wie bei *harp-2* die T-DNA eine korrekte Proteinbildung stören. Ebenso könnte die Transkription durch die T-DNA-Insertion abgebrochen und innerhalb der T-DNA neu gestartet werden, da sich Promotoren innerhalb der T-DNA befinden. Dies könnte zur Bildung von zwei mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht funktionalen Proteinfragmenten führen. Während es bei den möglicherweise gebildeten Proteinfragmenten in 3'-Richtung der T-DNA zu einer Verschiebung des Leserasters kommen kann, ist dies für Fragmente in 5'-Richtung nicht der Fall. Solche Fragmente würden jedoch nicht alle Domänen des Proteins beinhalten, sondern nur die Harp-Domäne und einen Teil der SNF2-Domäne. Dies gilt aufgrund der räumlichen Nähe der T-DNA-Insertionen für beide Insertionslinien.



**Abbildung 3.5: Quantitative Expressionsanalyse der verwendeten *harp*-Insertionslinien.** Das Expressionsniveau wurde mithilfe dreier verschiedener Primerkombinationen mittels quantitativer RT-PCR getestet. Die Primerpaare binden in 5'-Richtung der T-DNA-Insertion (A), überspannen diese im genomischen Bereich (B) oder binden in 3'-Richtung der Insertion (C). Die ungefähre Lage der Primerpaare ist im oberen Bildabschnitt mit Pfeilen gekennzeichnet. Diese binden stets in Exons des Gens. Die als Matrize verwendete cDNA wurde durch reverse Transkriptase unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern aus der isolierten Gesamt-RNA der Linien gewonnen. Die Expressionsdaten der Insertionslinien wurden auf die des *ACTIN2* Haushaltsgens normalisiert. Bei beiden *harp*-Insertionslinien konnte im Durchschnitt eine erhöhte Expression (176 % beziehungsweise 193 %) des Genabschnittes in 5'-Richtung der T-DNA-Insertion (A) gemessen werden. Bei der Primerkombination B wurde hingegen bei beiden Linien nahezu keine (0,033 % bei *harp-2* beziehungsweise 0,021 % bei *harp-4*) detektiert. Die Expression in 3'-Richtung der T-DNA (C) beträgt bei *harp-2* circa 250 % und bei *harp-4* lediglich 5,4 % des Wildtyps. Die Säulen geben die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen an, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar.

Die Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalyse der *ah2*-Insertionslinien sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Bei beiden Insertionslinien ist die Genexpression in 5'-Richtung der Insertionsstelle vergleichbar hoch wie beim Wildtyp. Mit dem die Insertion überspannenden Primerpaar wurde bei der *ah2-3*-Insertionslinie eine geringe Restexpression von 3,4 % detektiert, welche bei der *ah2-4*-Insertionslinie nahezu nicht vorhanden ist (0,027 %). In 3'-Richtung der T-DNA war bei *ah2-3* eine im Vergleich zum Wildtyp geringere Expres-

sionsrate von 20 % festzustellen, während bei *ah2-4* wie bei den *harp*-Insertionslinien eine gesteigerte Genexpression (456,5 %) gemessen wurde. Da bei allen *harp*- und *ah2*-Insertionslinien eine Beeinträchtigung der Genexpression durch die inserierten T-DNAs festgestellt wurde, konnten alle Linien für die funktionale Untersuchung von HARP und AH2 verwendet werden.



**Abbildung 3.6: Quantitative Expressionsanalyse der verwendeten *ah2*-Insertionslinien.** Das Expressionsniveau wurde mithilfe dreier verschiedener Primerkombinationen mittels quantitativer RT-PCR getestet. Die Primerpaare binden in 5'-Richtung der T-DNA-Insertion (A), überspannen diese im genomischen Bereich (B) oder binden in 3'-Richtung der Insertion (C). Die ungefähre Lage der Insertion ist im oberen Bildabschnitt mit Pfeilen gekennzeichnet. Diese binden stets in Exonbereichen des Gens. Die als Matrize verwendete cDNA wurde durch reverse Transkriptase unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern aus der isolierten Gesamt-RNA der Linien gewonnen. Die Expressionsdaten der Insertionslinien wurden auf die des *ACTIN2* Haushaltsgens normalisiert. Mit der Primerkombination A wurde durchschnittlich bei *ah2-3* eine im Vergleich zum Wildtyp geringere Expression (67,8 %) gemessen, während diese bei *ah2-4* der des Wildtyps entspricht. Die Expression mit den Insert-überspannenden Primern (B) liegt bei 3,35 % bei *ah2-3* beziehungsweise bei 0,027 % bei *ah2-4*. In 3'-Richtung der Insertion (C) konnte bei *ah2-3* eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Expression von 20 % gemessen werden, während diese bei *ah2-4* um 356,5 % erhöht ist. Die Säulen geben die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen an, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar.

### 3.1.2 Sensitivitäten von *harp*- und *ah2*-Insertionsmutanten gegenüber genotoxischem Stress

Menschliche HARP-defiziente Zelllinien zeigen unter anderem erhöhte Sensitivitäten gegenüber den genotoxischen Agenzien CPT, MMC, und HU. AH2-defizienten Zellen konnten Sensitivitäten gegenüber CPT, Cisplatin und HU nachgewiesen werden. Bei allen der Genotoxine handelt es sich um Replikationsstress verursachende Chemikalien, weswegen den Annealing Helikasen im Menschen eine Funktion in der Antwort auf Replikationsstress nachgesagt wird. Um die Rolle der putativen Homologe der Annealing Helikasen in *Arabidopsis* zu untersuchen, wurden *harp*- und *ah2*-Insertionslinien auf ihre Sensitivitäten gegenüber der Agenzien CPT, MMC und HU getestet. Um eventuelle Interaktionen bei der Antwort auf die verschiedenen DNA-Schäden zu überprüfen, wurden

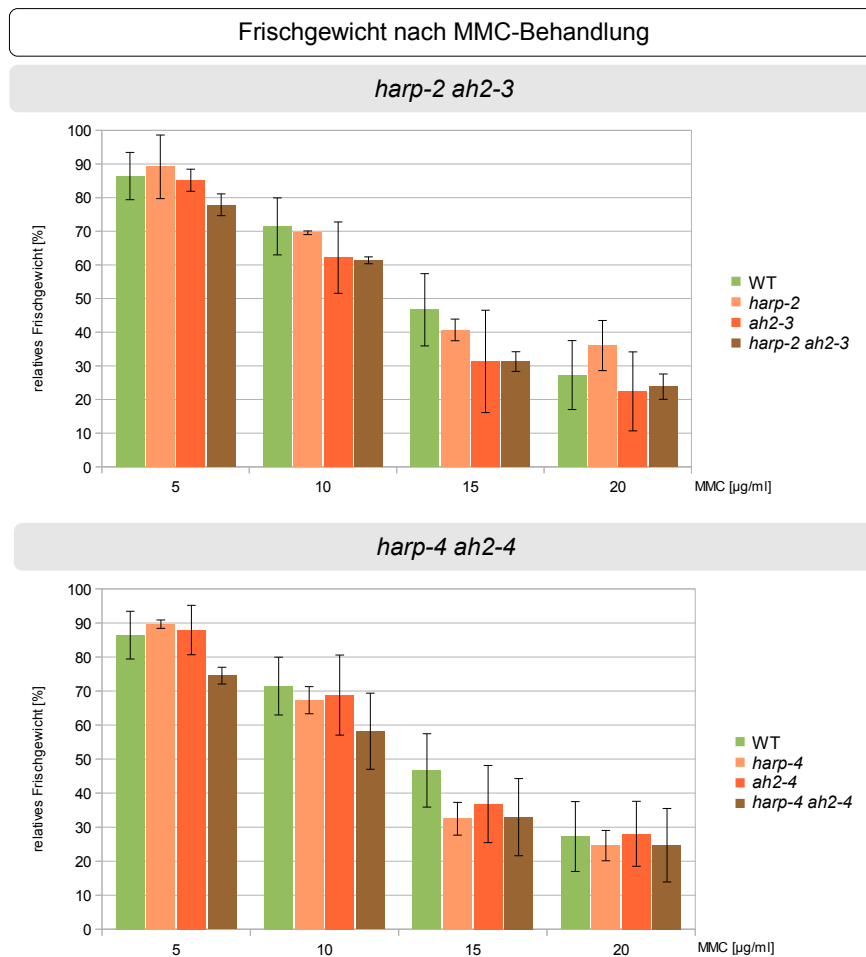
zudem durch Kreuzungen *harp ah2* Doppelmutanten erzeugt, welche parallel zu den Einzelmutanten und dem Wildtyp Sensitivitätstests unterzogen wurden. Dafür wurden sieben Tage alte Keimlinge, welche unter sterilen Bedingungen auf GM Festmedium angezogen wurden, in 6-Well-Plates mit Flüssigmedium umgesetzt. Am Folgetag wurden die Genotoxine in verschiedenen Endkonzentrationen hinzugegeben und die Keimlinge darin für zwei Wochen inkubiert. Die steigenden Konzentrationen beeinträchtigten entsprechend verstärkt das Wachstum aller Linien, inbegriffen das des Wildtyps. Nach der Inkubation wurde das Frischgewicht mithilfe einer Analysenwaage bestimmt und für die Auswertung relativ zu den Frischgewichten der unbehandelten Pflanzen der jeweiligen Linie im direkten Vergleich dargestellt. Die Sensitivitätstests erfolgten in mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen. Es wurden beide Insertionslinien von sowohl *harp* als auch *ah2* miteinander gekreuzt, weswegen durch die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der Linien insgesamt vier Doppelmutantenlinien etabliert wurden. Da sich diese in den Sensitivitätstests stark ähneln, werden exemplarisch die Ergebnisse der Doppelmutanten *harp-2 ah2-3* und *harp-4 ah2-4* in diesem Kapitel dargestellt, während die Diagramme der Sensitivitätstest mit den Doppelmutantenlinien *harp-2 ah2-4* und *harp-4 ah2-3* dem Anhang dieser Arbeit (Abbildungen A.1 - A.3) zu entnehmen sind.

Die Ergebnisse der Sensitivitätstests mit dem Genotoxin MMC sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Sowohl bei der Doppelmutante *harp-2 ah2-3*, als auch bei der Linie *harp-4 ah2-4* lassen sich für alle getesteten Konzentrationen keine signifikanten Wachstumsunterschiede der Doppelmutanten und der Einzelmutanten gegenüber dem Wildtyp feststellen. Dies ist auch bei den Sensitivitätstests mit HU der Fall (Abbildung 3.8). Ein anderes Ergebnis zeigt sich bei dem Genotoxin CPT, welches in Abbildung 3.9 dargestellt ist. Nach Behandlung mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  CPT weisen die beiden *harp*-Insertionslinien keinen Wachstumsdefekt auf, wohingegen beide *ah2* Einzelmutanten ein deutlich verringertes relatives Frischgewicht zeigen. Dies ist bei der geringsten verwendeten Konzentration (50  $\mu\text{M}$  CPT) am deutlichsten zu sehen und liegt hier bei circa 60% des Wildtyps. Die beiden Doppelmutanten verhalten sich bezüglich ihrer Sensitivität wie der Wildtyp und die *harp*-Insertionslinien. Demnach wird durch den Ausfall von HARP in AH2-defizienten Pflanzenlinien die Sensitivität der *ah2-4*-Mutantenlinie aufgehoben.

### 3.1.3 *At*HARP in der homologen Rekombination

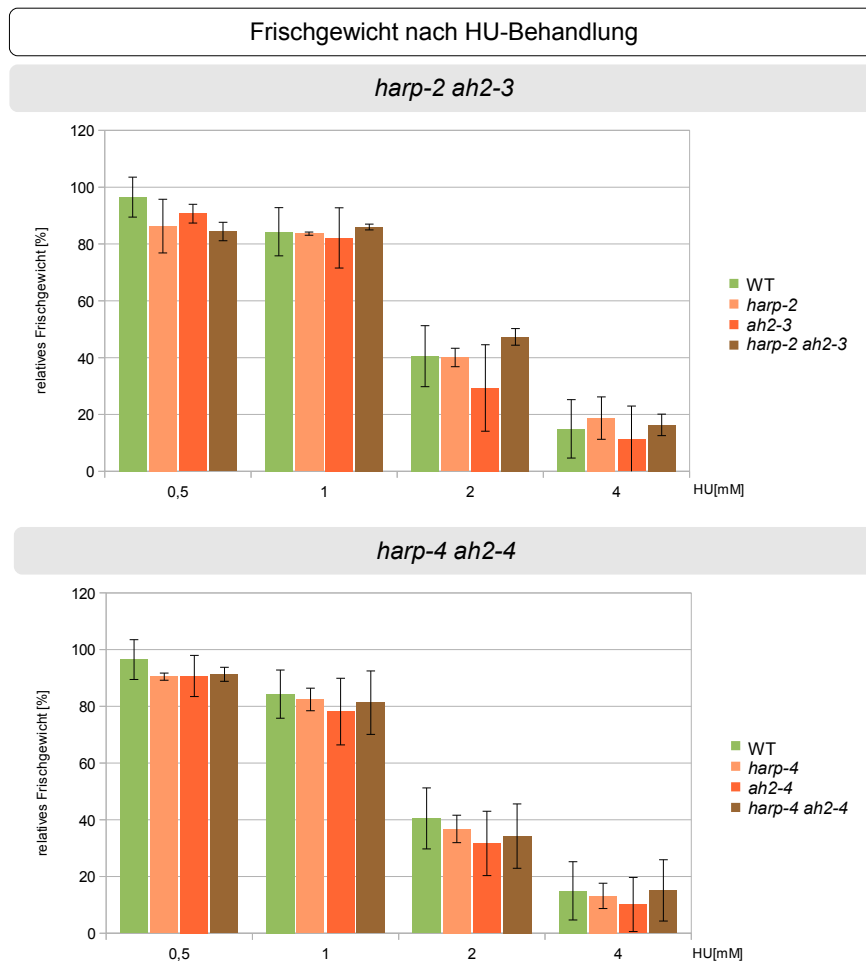
Für die Annealing Helikasen *HsHARP* und *HsAH2* wird eine Funktion in verschiedenen zellulären Prozessen postuliert, Annealing-Aktivitäten werden beispielsweise für die Regression von blockierten Replikationsgabeln benötigt. Aber auch bei dem Annealing homologer Sequenzabschnitte bei allen Mechanismen der HR könnten Annealing Helikasen eine Rolle spielen (Übersicht: Wu, 2012). Um die mögliche Funktion von *AtHARP* in der HR zu untersuchen, wurden mit den Insertionslinien *harp-2* und *harp-4* Rekombinationstests durchgeführt.

Hierfür wurden die beiden Insertionslinien mit Reporterkonstrukt tragenden Linien gekreuzt und in der F2-Generation über PCR-basierte Genotypisierungen diejenigen Pflanzen identifiziert, welche das Reporterkonstrukt homozygot tragen und entweder homozygote Insertionsmutanten oder homozygot bezüglich des Wildtyp-Allels von *HARP* waren.



**Abbildung 3.7: Reparatur von DNA-Schäden nach MMC-Behandlung in *harp ah2* Einzel- und Doppelmutanten.** Die Insertionslinien *harp-2*, *harp-4*, *ah2-3*, *ah2-4* sowie deren Doppelmutanten *harp-2 ah2-3* und *harp-4 ah2-4* wurden mit 5, 10, 15 und 20 µg/ml MMC behandelt. Dargestellt ist das zu den unbehandelten Pflanzen relative Frischgewicht nach Behandlung der einzelnen Linien im Vergleich zum Wildtyp. Die Einzel- und Doppelmutanten zeigen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Sensitivität. Die Säulen geben die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen an, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar.

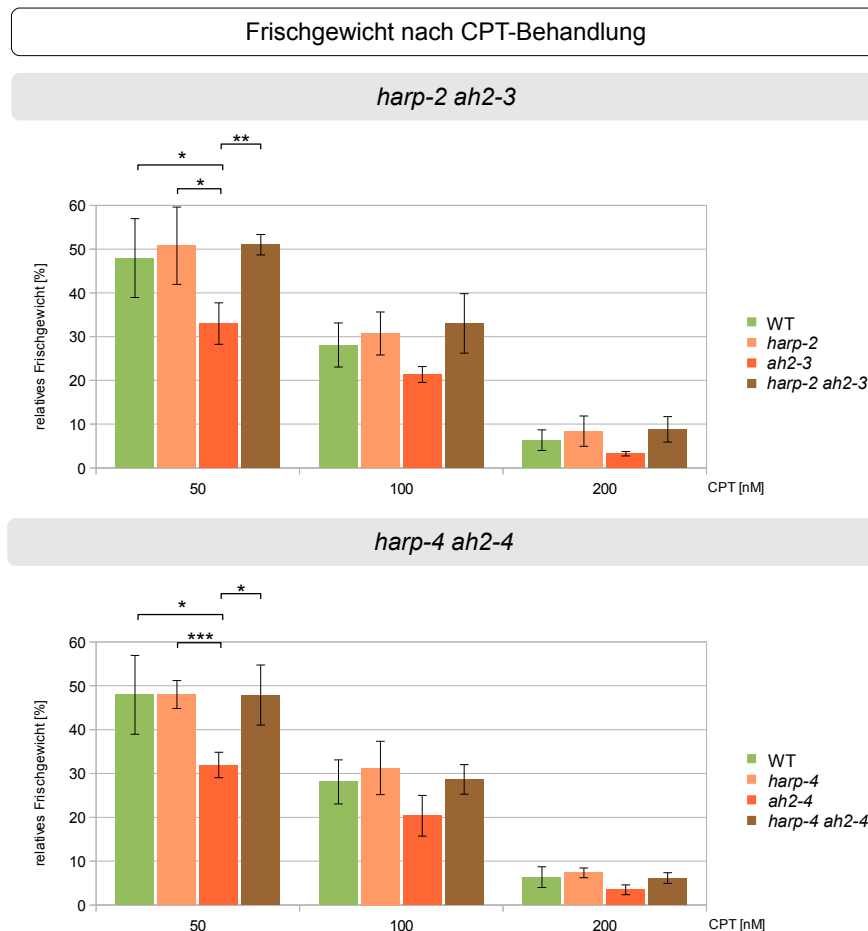
Diese Pflanzen wurden weiter vermehrt und das Saatgut der nächsten Generation wurde für mutageninduzierte Rekombinationstests verwendet. Bei den Rekombinationskonstrukten handelte es sich um DGU.US zum Nachweis der Reparatur von DNA-Schäden über SSA, DU.GUS und DGU.US zum Nachweis der Reparatur über SDSA und IC9 zum Nachweis der Reparatur über interchromosomale HR. Die Reporterkonstrukte sind in Kapitel 2.2.18 im Detail beschrieben und sind in Abbildung 3.10 schematisch dargestellt. Mittels Genotoxininduktion können spontane HR-Raten mit induzierten HR-Raten in den Linien verglichen werden. Jedoch induzieren Genotoxine unspezifisch DNA-Schäden, sodass im Falle des DGU.US-Konstruktes nicht nur von Reparaturereignissen durch SSA ausgegangen werden kann. Entsteht ein DNA-Schaden außerhalb der Linkersequenz der *GUS*-Fragmente, kann es auch durch andere Reparaturwege zur Restauration des Reportergens kommen. Durch I-SceI-Erkennungssequenzen innerhalb der Linkersequenzen in den Konstrukten DGU.US, DU. und IU.GUS lassen sich spezifisch DSBs innerhalb die-



**Abbildung 3.8: Reparatur von DNA-Schäden nach HU-Behandlung in *harp ah2* Einzel- und Doppelmutanten.** Die Insertionslinien *harp-2*, *harp-4*, *ah2-3*, *ah2-4* sowie deren Doppelmutanten *harp-2 ah2-3* und *harp-4 ah2-4* wurden mit 0,5, 1, 2 und 4 mM HU behandelt. Dargestellt ist das zu den unbehandelten Pflanzen relative Frischgewicht nach Behandlung der einzelnen Linien im Vergleich zum Wildtyp. Die Einzel- und Doppelmutanten zeigen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Sensitivität. Die Säulen geben die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen an, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar.

ser Sequenzen induzieren. Hierfür müssen Reporterkonstrukt tragende Linien mit I-SceI-Expressionskassette tragenden Linien gekreuzt werden.

Für die Rekombinationstests mit Genotoxininduktion wurden *Arabidopsis*-Keimlinge steril auf GM Festmedium angezogen und nach sieben Tagen in GM Flüssigmedium umgesetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Bleomycin- beziehungsweise MMC-Zugabe, durch welche sich eine Endkonzentration der Genotoxine von 5 µg/ml im Medium ergab. Für die Analyse der Reparatur spontan auftretender Rekombinationsereignisse wurde bei jeweils der Hälfte der Pflanzen kein Genotoxin hinzugegeben. Nach weiteren sechs Tagen Inkubation fand die histochemische Färbung statt: die Pflanzen wurden aus dem GM Flüssigmedium in X-GlcA-haltige Färbelösung überführt und darin für zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Dabei konnte das restaurierte *GUS*-Reportergen das künstliche Substrat X-GlcA zu einem unlöslichen Indigofarbstoff umsetzen. Nach Entfärbung der Pflanzen in



**Abbildung 3.9: Reparatur von DNA-Schäden nach CPT-Behandlung in *harp ah2* Einzel- und Doppelmutanten.** Die Insertionslinien *harp-2*, *harp-4*, *ah2-3*, *ah2-4* sowie deren Doppelmutanten *harp-2 ah2-3* und *harp-4 ah2-4* wurden mit 50, 100 und 200  $\mu$ M CPT behandelt. Dargestellt ist das zu den unbehandelten Pflanzen relative Frischgewicht nach Behandlung der einzelnen Linien im Vergleich zum Wildtyp. Die beiden *harp*-Insertionslinien weisen keine Sensitivität gegenüber CPT-Behandlung auf, während die beiden *ah2* Einzelmutanten ein deutlich geringeres relatives Frischgewicht zeigen. Dies ist bei 50  $\mu$ M CPT am deutlichsten erkennbar. Hier liegt das Frischgewicht der *ah2* Einzelmutanten bei circa 60% des Wildtyps. Bei den jeweiligen Doppelmutanten ist die Sensitivität der *ah2* Einzelmutante aufgehoben. Die Säulen geben die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen an, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar. Signifikanzniveaus wurden mit Klammern über den jeweiligen Balken gekennzeichnet ( $p < 0,001$ : \*\*\*,  $0,01 > p > 0,001$ : \*\*,  $0,05 > p > 0,01$ : \*), nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht gekennzeichnet.

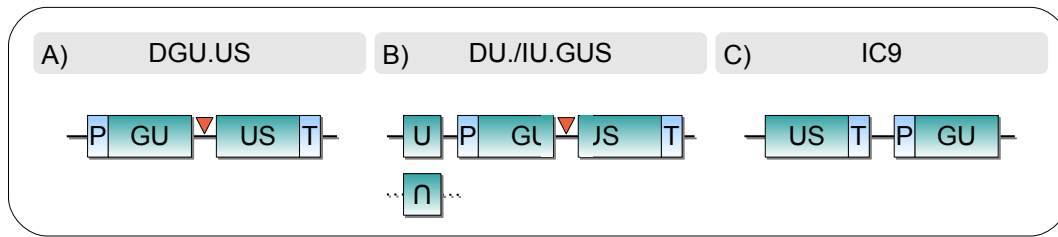
vergälltem EtOH konnte die Rekombinationsrate durch Auszählen der blauen Sektoren im Pflanzengewebe bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte relativ zum Wildtyp.

Die Ergebnisse der Rekombinationstests mit *harp-2* und *harp-4* und den Rekombinationskonstrukten DGU.US, DU.GUS und IU.GUS sind in Abbildung 3.11 dargestellt, die Ergebnisse der Rekombinationstests im IC9-Reporterhintergrund sind Abbildung 3.12 zu entnehmen. Bei den Reporterkonstrukten DGU.US, DU.GUS und IU.GUS findet bei beiden Insertionslinien eine Reduktion der HR statt. Dies ist sowohl im uninduzierten Zustand, als auch nach Schadensinduktion durch genotoxische Agenzien der Fall. Bei Verwendung des DGU.US-Konstruktes zur Detektion von somatischen HR-Ereignissen durch SSA lässt sich sowohl im uninduzierten als auch im Bleomycin-induzierten Zustand ein Rückgang der HR zwischen 40 und 60 % des Wildtyps feststellen. Die Schadensinduktion für die Konstrukte DU.GUS und IU.GUS zum Nachweis von SDSA-Ereignissen erfolgte durch MMC, da dies für diese Konstrukte einen deutlicheren Effekt erzielt als Bleomycin-Induktion. Bei DU.GUS ist die deutliche relative Abnahme der Rekombinationsrate in den Insertionslinien durch MMC-Zugabe nochmals größer als im uninduzierten Zustand. Im uninduzierten Zustand betragen die relativen HR-Raten circa 60 - 70 % des Wildtyps und im induzierten Zustand circa 20 - 30 % des Wildtyps. Für die Rekombinationsraten der *harp-2* Linie mit DU.GUS im uninduzierten Zustand konnte aufgrund großer Schwankungen der Anzahl von blauen Sektoren zwar ein deutlicher, jedoch kein signifikanter Rückgang der HR detektiert werden. Anhand der Daten der *harp-4*-Linie konnte ein signifikanter Rückgang der HR bestätigt werden. Die Tendenz der Abnahme der HR-Ereignisse ist ebenfalls bei dem IU.GUS-Konstrukt zu verzeichnen, jedoch sind die Unterschiede zwischen uninduziertem (circa 40 - 70 % des Wildtyps) und induziertem Zustand (circa 25 - 40 % des Wildtyps) hier weniger stark ausgeprägt als beim DU.GUS-Konstrukt.

Bei den Linien im IC9-Hintergrund konnte uninduziert keine Veränderung der HR-Raten in den Mutantenlinien im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Bei der *harp-4*-Linie konnte nach Bleomycin-Induktion eine signifikante Reduktion der HR nachgewiesen werden, welche circa 20 - 60 % des Wildtyps entspricht.

Zur Überprüfung der Rekombinationsraten nach spezifischer DSB-Induktion innerhalb der Linkersequenzen der Reporterkonstrukte wurden I-Scel-induzierte Rekombinationstests im DGU.US, DU.GUS und IU.GUS-Reporterhintergrund durchgeführt. Hierfür wurden die bereits für mutageninduzierte Rekombinationstests verwendeten homozygoten Linien in I-Scel-exprimierende Linien eingekreuzt, welche ebenfalls homozygot bezüglich der T-DNA-Insertion in *HARP* beziehungsweise des Wildtyp-Allels waren. Das daraus resultierende Saatgut wurde direkt für die Rekombinationstests eingesetzt. Es war dementsprechend hemizygot bezüglich des Reporterkonstruktes und der I-Scel Expressionskassette und homozygot bezüglich der T-DNA-Insertion in *HARP* beziehungsweise des Wildtyp-Allels. Die Anzucht der Keimlinge für die Rekombinationstests erfolgte auf gentamycinhaltigem GM Festmedium. Da für die Kreuzungen stets die I-Scel-exprimierende Linie als Vaterpflanze verwendet wurde, konnte durch die Verwendung des Selektionsmediums sichergestellt werden, dass die Bestäubung durch die gewählte Vaterpflanze



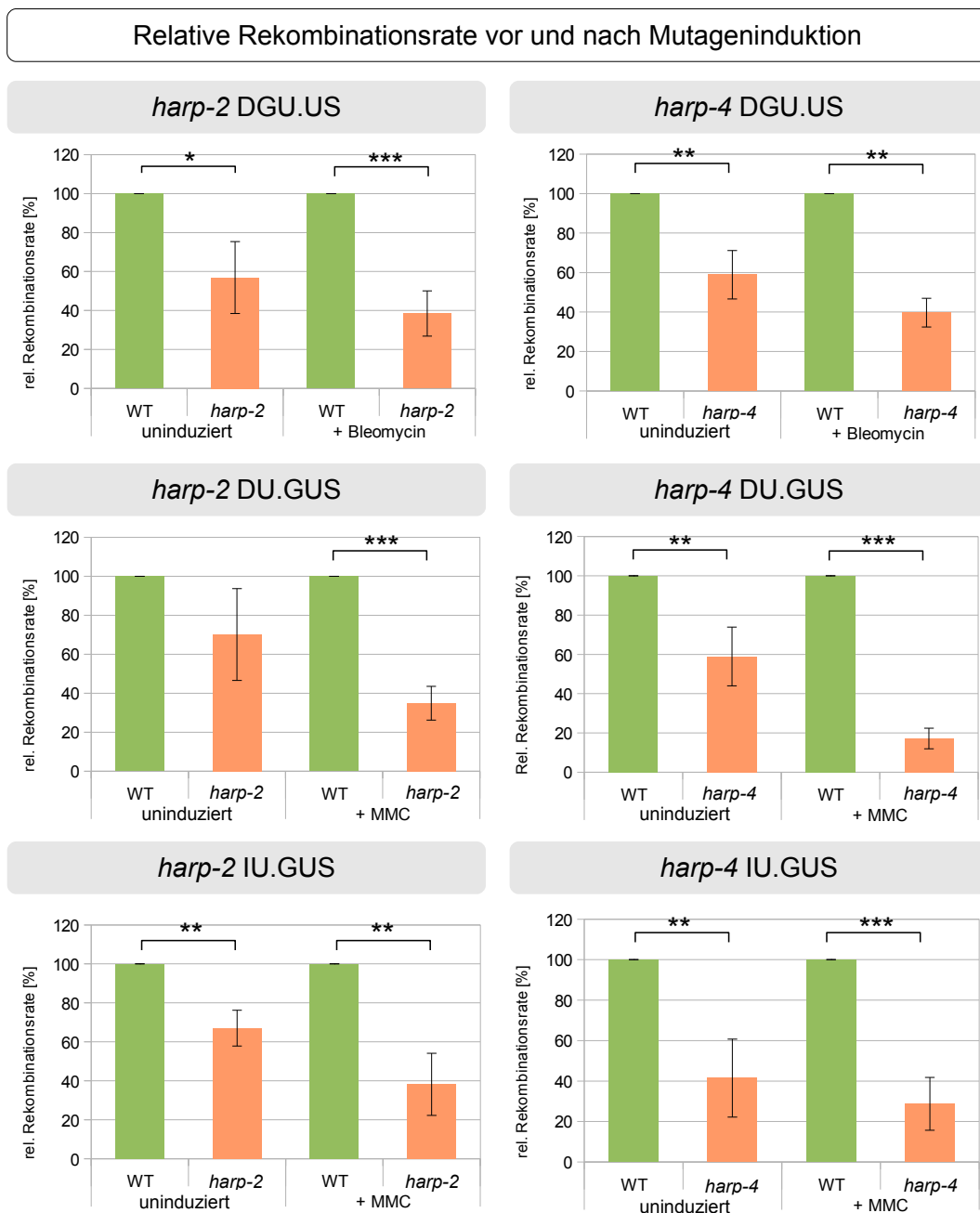


**Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der verwendeten *GUS*-Reporterkonstrukte.** Alle Reporterkonstrukte basieren auf einem nichtfunktionalen *GUS*-Reportergeren, welches bei jedem Konstrukt über einen spezifischen Reparaturweg zu einem funktionalen *GUS*-Gen restauriert werden kann. Das DGU.US Reporterkonstrukt dient dem Nachweis der Reparatur von DNA-Schäden über SSA. Das *GUS*-Gen ist durch eine Linkersequenz in zwei Hälften unterteilt, wobei die endständigen U-Sequenzen überlappen (A). Die DU.GUS und IU.GUS-Konstrukte dienen dem Nachweis der Reparatur über SDSA. Auch sie tragen ein durch eine Linkersequenz in zwei Hälften unterteiltes *GUS*-Gen, jedoch gibt es bei diesem Konstrukt keine Sequenzüberlappungen. Die zur Reparatur benötigte homologe Sequenz (U) befindet sich N-terminal des nichtfunktionalen *GUS*-Gens und liegt bei DU.GUS in direkter Orientierung zum Gen vor (obere Darstellung), während sie bei IU.GUS in inverser Orientierung befindet (untere Darstellung; B). Die roten Dreiecke über der Linkersequenz der DGU.US und DU./IU.GUS-Konstrukte markieren eine I-SceI-Schnittstelle, über die in I-SceI-induzierten Rekombinationstests spezifische DSBs eingefügt werden können. Das IC9-Konstrukt dient dem Nachweis von interchromosomaler HR. Die beiden Hälften des *GUS*-Gens liegen hierbei in umgekehrter Reihenfolge zueinander vor (C).

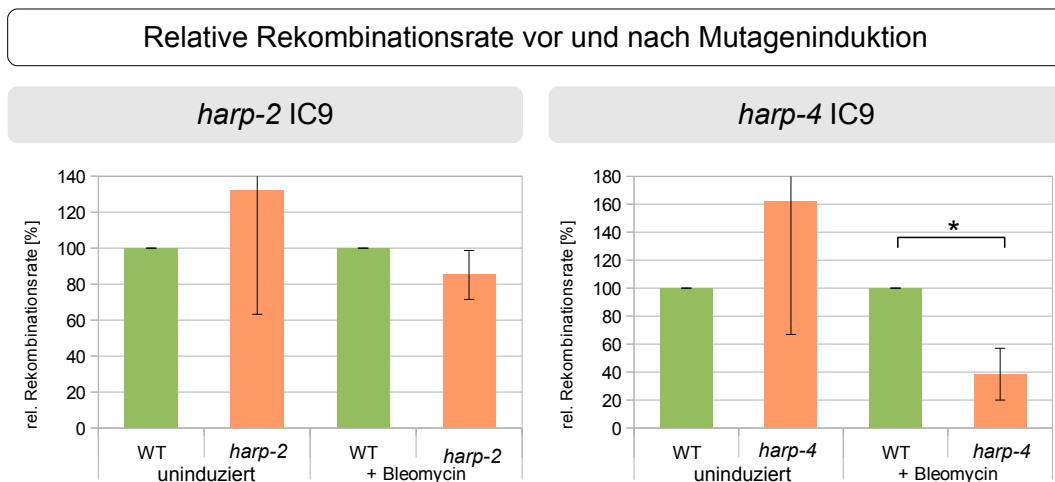
erfolgte. Nach zweiwöchiger Inkubation auf dem Festmedium erfolgte die Färbung und Auswertung der Rekombinationstests analog zu den genotoxininduzierten Rekombinationstests. Die Ergebnisse der I-SceI-induzierten Rekombinationstests sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Mit allen drei getesteten Reporterkonstrukten konnte bei beiden Insertionslinien ein deutlicher Rückgang der somatischen HR im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Dieser beträgt mit dem DGU.US-Konstrukt zwischen 20 und 30 % und mit den Konstrukten DU.GUS und IU.GUS zwischen 50 und 80 %.

### 3.2 Untersuchungen zur Funktion von REV3 in *A. thaliana*

Der TLS-Polymerase POL $\zeta$  wurden in *Arabidopsis* bereits Funktionen in der Reaktion auf verschiedene DNA-Schäden nachgewiesen. REV3 ist die katalytische Untereinheit der TLS-Polymerase POL $\zeta$ . *Atrev3*-Insertionslinien reagieren hypersensitiv auf die genotoxischen Agenzien MMC, MMS, Cisplatin, sowie UV-B- und Gammastrahlung (Sakamoto *et al.*, 2003, Takahashi *et al.*, 2005). Um diese Funktionen weiter zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Komplementationsstudien und Doppelmutantenanalysen durchgeführt. Für die Komplementationsstudien wurde eine REV3-defiziente Pflanzenlinie zum einen mit einem Wildtyp-Konstrukt und zum anderen mit Konstrukten transformiert, welche Punktmutationen in konservierten Aminosäuren der Polymerasedomänen tragen. Mit den daraus etablierten homozygoten *single locus*-Linien wurden Sensitivitätstests durchgeführt, um die Rolle der zwischen verschiedenen Organismen hoch konservierten Aminosäuren in REV3 im Zusammenhang mit dessen Funktion bei der Reaktion auf verschiedene genotoxische Agenzien zu analysieren. Die durchgeführten Doppelmutantenanalysen dienen der Zuordnung von REV3 in die verschiedenen Wege der Reaktion auf bestimmte DNA-Schäden. Hierfür wurden *rev3*-Insertionslinien mit Mutanten der Reparaturfaktoren MUS81, RECQ4A und ATR gekreuzt und die etablierten Doppelmutanten in Sensitivitätstests untersucht.



**Abbildung 3.11: Rekombinationsraten der *harp*-Insertionslinien vor und nach Mutageninduktion.** Mit Hilfe der Reporterkonstrukte DGU.US, DU.GUS und IU.GUS wurde die somatische Rekombinationsrate in den Insertionslinien *harp-2* und *harp-4* untersucht. Dies geschah uninduziert, sowie induziert durch Genotoxinzugabe (Bleomycin bei DGU.US, MMC bei DU. und IU.GUS; Endkonzentration: 5 µg/ml). Mit Ausnahme der Mutantenlinie *harp-2* im DU.GUS-Hintergrund im uninduzierten Zustand, welche zwar einen deutlichen, jedoch nicht signifikanten Rückgang der HR aufweist, konnte durch alle untersuchten Reporterkonstrukte ein signifikanter Rückgang der HR in den beiden *harp*-Insertionslinien nachgewiesen werden. Die Säulen geben die Mittelwerte aus drei biologisch unabhängigen Durchgängen an, der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Mittelwerte dar. Die berechneten Signifikanzniveaus wurden mit Klammern über den jeweiligen Balken gekennzeichnet ( $p < 0,001$ : \*\*\*,  $0,01 > p > 0,001$ : \*\*,  $0,05 > p > 0,01$ : \*), nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht gekennzeichnet.



**Abbildung 3.12: Rekombinationsraten der *harp*-Insertionslinien vor und nach Mutageninduktion: IC9-Konstrukt.** Mithilfe des Reporterkonstruktes IC9 wurde die somatische Rekombinationsrate in den Insertionslinien *harp-2* und *harp-4* untersucht. Dies geschah uninduziert, sowie induziert durch Bleomycinzugabe (Endkonzentration: 5 µg/ml). Uninduziert konnte kein Unterschied der Rekombinationsraten des Wildtyps und der Insertionslinien festgestellt werden. Nach Induktion von DNA-Schäden durch Bleomycin zeigt die Insertionslinie *harp-4* einen signifikanten Rückgang der HR. Die Säulen geben die Mittelwerte aus drei biologisch unabhängigen Durchgängen an, der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Mittelwerte dar. Die berechneten Signifikanzniveaus wurden mit Klammern über den jeweiligen Balken gekennzeichnet ( $p < 0,001$ : \*\*\*,  $0,01 > p > 0,001$ : \*\*,  $0,05 > p > 0,01$ : \*), nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht gekennzeichnet.

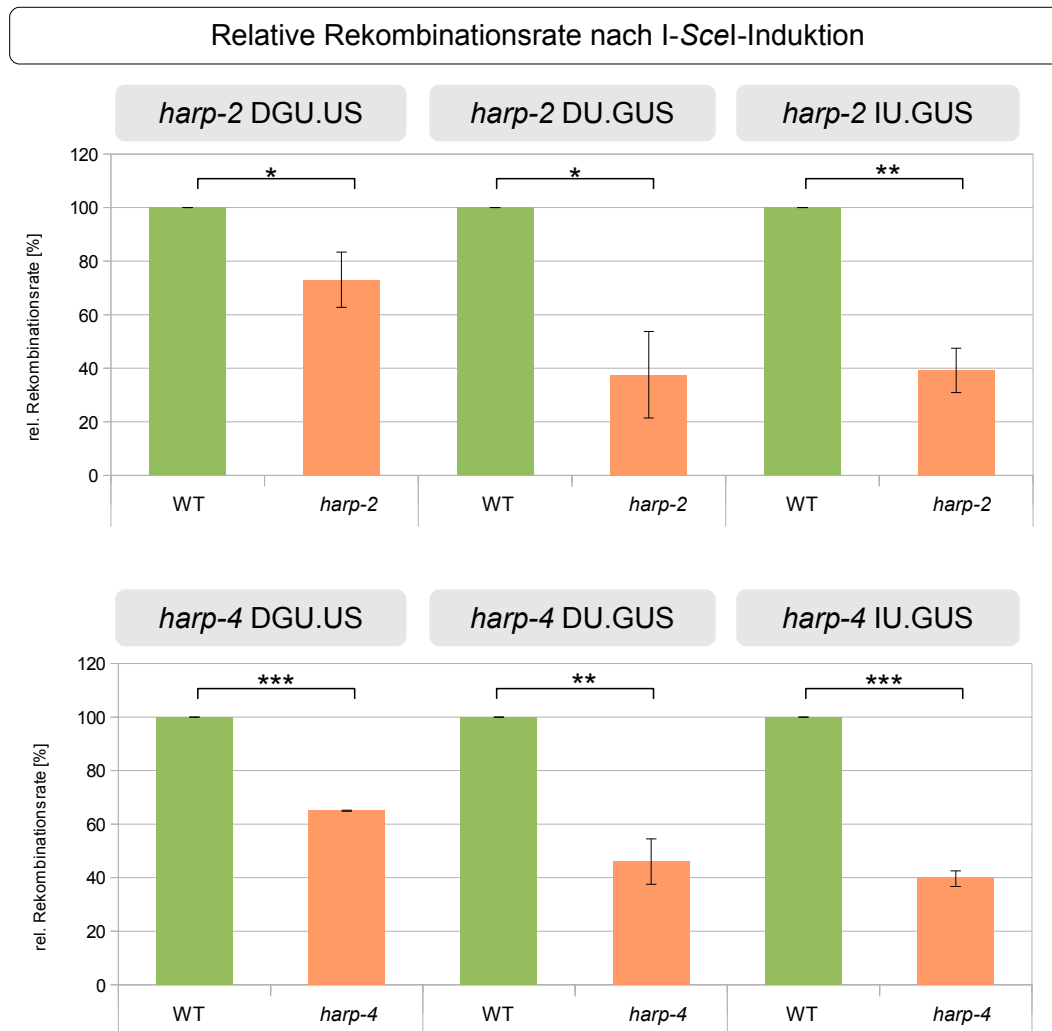
Insgesamt wurden für die durchgeführten Arbeiten drei T-DNA-Insertionslinien verwendet: *rev3-2* (SALK\_029237), *rev3-3* (SALK\_067237) und *rev3-5* (SALK\_126789). Für Komplementationsstudien wurde die Mutante *rev3-2* eingesetzt, während zur Etablierung von Doppelmutanten mit anderen Faktoren der DNA-Reparatur von *Arabidopsis* für Sensitivitätstests die Insertionslinien *rev3-3* und *rev3-5* verwendet wurden. Die *rev3-2*-Insertionslinie trägt eine reziproke Chromosomentranslokation zwischen den Chromosomen I und V, welche durch die inserierte T-DNA auf Chromosom I verursacht wurde (Curtis *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Insertionslinie *rev3-5* neu charakterisiert und bei den Doppelmutantenanalysen mit der bereits charakterisierten Linie *rev3-3* mitgeführt (Sakamoto *et al.*, 2003).

### 3.2.1 Charakterisierung der T-DNA Insertionsmutante *rev3-5*

Zur Charakterisierung der *rev3-5*-Insertionslinie analog zu den Mutantenlinien der Annealing-Helikasen eine Insertionsortbestimmung und Expressionsanalyse durchgeführt.

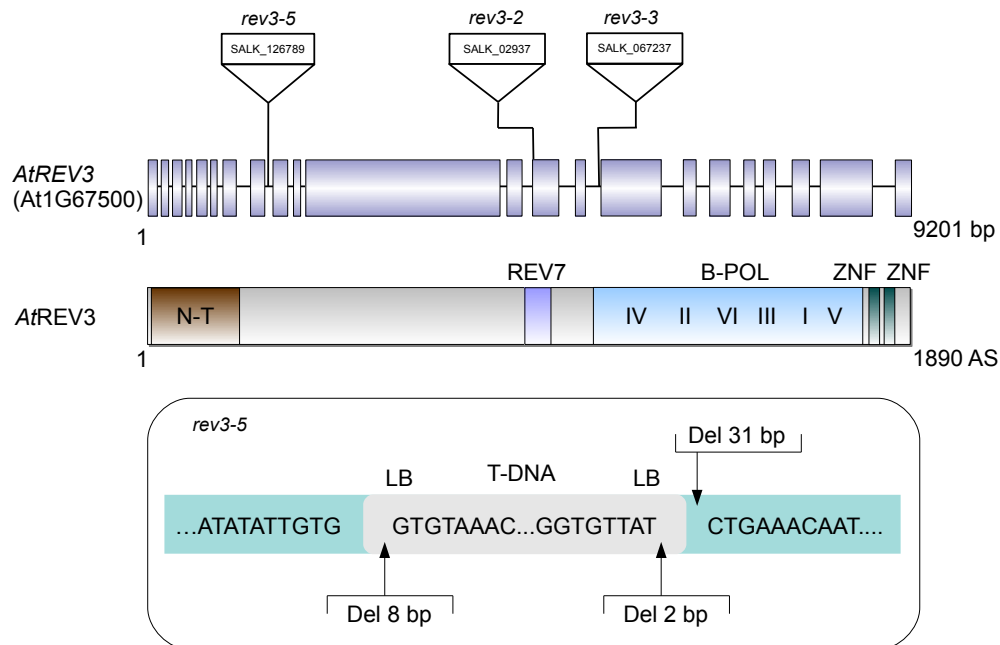
#### Insertionsortbestimmung

Die Insertion der *rev3-5*-Insertionslinie befindet sich im Intron acht zwischen den Exons acht und neun der insgesamt 22 Exons und liegt somit im Vergleich der Insertionen der Linien *rev3-2* (13. Exon) und *rev3-3* (Übergang 14. Intron/15. Exon) weiter vorne im Gen. Die Ergebnisse der Insertionsortbestimmung sind in Abbildung 3.14 dargestellt und zeigen, dass sich auf jeder Seite der Insertion eine LB befindet, weswegen es sich um eine Mehrfachinsertion von T-DNAs handelt. Bei beiden LBs am Übergang zur genomischen DNA fand eine Deletion am äußersten Bereich der LB statt, sodass bei der 5' liegenden LB 8 bp und bei der 3' liegenden LB 2 bp fehlen. Im Bereich der 3' gelegenen LB



**Abbildung 3.13: Rekombinationsraten der *harp*-Insertionslinien nach I-SceI-Induktion.** Mithilfe der Reporterkonstrukte DGU.US, DU.GUS und IU.GUS wurde die somatische Rekombinationsrate in den Insertionslinien *harp-2* und *harp-4* nach I-SceI-Induktion untersucht. Die Erkennungssequenz der Meganuklease I-SceI befindet sich innerhalb der Linkersequenz der Reporterkonstrukte. Somit werden in diesen Rekombinationstests spezifische DSBs in den Reporterkonstrukten induziert. Sowohl für *harp-2*, als auch für *harp-4* ist eine signifikante Abnahme der Rekombinationsrate in allen getesteten Konstrukten im Vergleich zum Wildtyp festzustellen. Der Rückgang bei DU.GUS und IU.GUS ist hierbei stärker als der bei DGU.US. Die relativen Rekombinationsraten betragen bei DGU.US etwa 70 % und bei IU. beziehungsweise DU.GUS etwa 40 % des Wildtyps. Die Säulen geben die Mittelwerte aus drei biologisch unabhängigen Durchgängen an, der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Mittelwerte dar. Signifikanzniveaus wurden mit Klammern über den jeweiligen Balken gekennzeichnet ( $p < 0,001$ : \*\*\*,  $0,01 > p > 0,001$ : \*\*,  $0,05 > p > 0,01$ : \*).

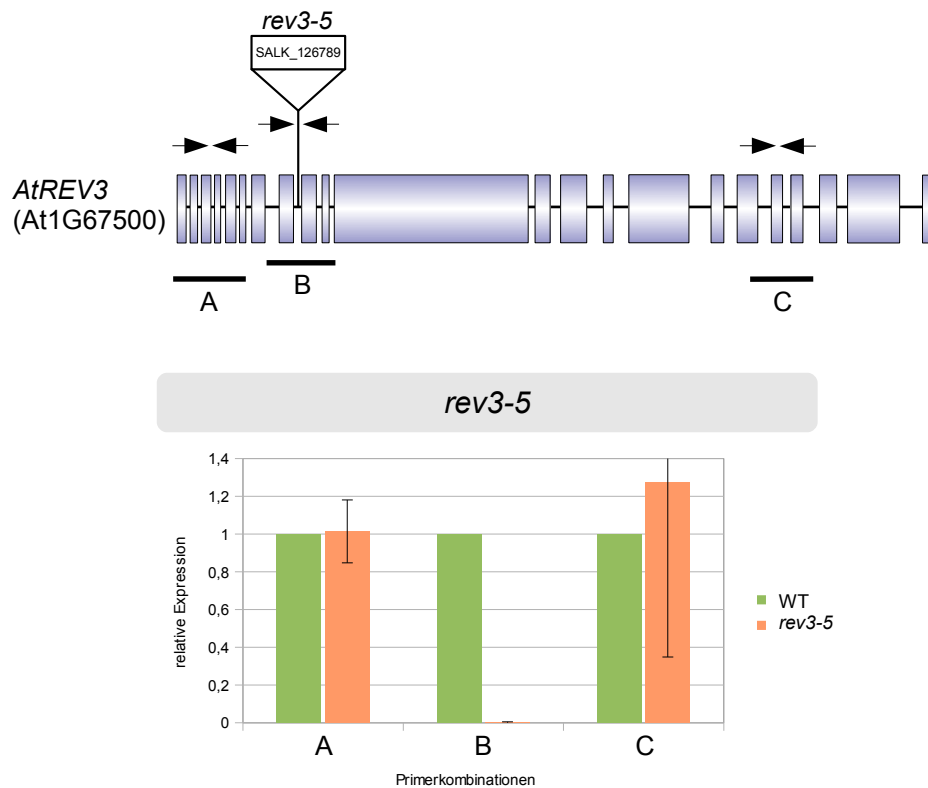
kam es zudem zu einer 31 bp umfassenden Deletion genomischer DNA (TGGTAGTTT-TATCTTCTTTTATATCACAAATA) und der Insertionsort der T-DNAs ergibt sich zwischen den Positionen 1826 und 1857 bp in Bezug auf das Start-Codon der genomischen Gensequenz.



**Abbildung 3.14: Übersicht über alle verwendeten *rev3* Insertionslinien und Insertionsortbestimmung der *rev3-5*-Insertionslinie.** *REV3* hat eine Länge von 9201 bp und ist in 22 Exons unterteilt. Im oberen Bildabschnitt sind die Integrationsorte der Insertionslinien *rev3-2* (SALK\_029237), *rev3-3* (SALK\_067237) und *rev3-5* (SALK\_126789) gekennzeichnet. Das Genprodukt von *REV3* umfasst 1890 AS und trägt mehrere, zwischen Organismen stark konservierte Regionen: die N-terminale Region (N-T), eine REV7-Bindedomäne (REV7), eine typisch für B-Polymerasen aufgebaute Polymerasedomäne (B-POL) sowie zwei Zinkfingermotive (ZNF). Im unteren Bildabschnitt ist die Insertionsortbestimmung der Insertionslinie *rev3-5* dargestellt. Da beide Seiten der Insertion mit einer LB abschließen, liegt eine Mehrfachinsertion von T-DNAs vor. Bei beiden zur genomischen DNA abgrenzenden LBs kam es zu einer kurzen Deletion, welche bei der 5' gelegenen LB 8 bp und bei der 3' gelegenen LB 2 bp umfasst. Zusätzlich wurde angrenzend zu der 3' gelegenen LB eine 31 bp umfassende Deletion genomischer DNA festgestellt.

### Expressionsanalyse

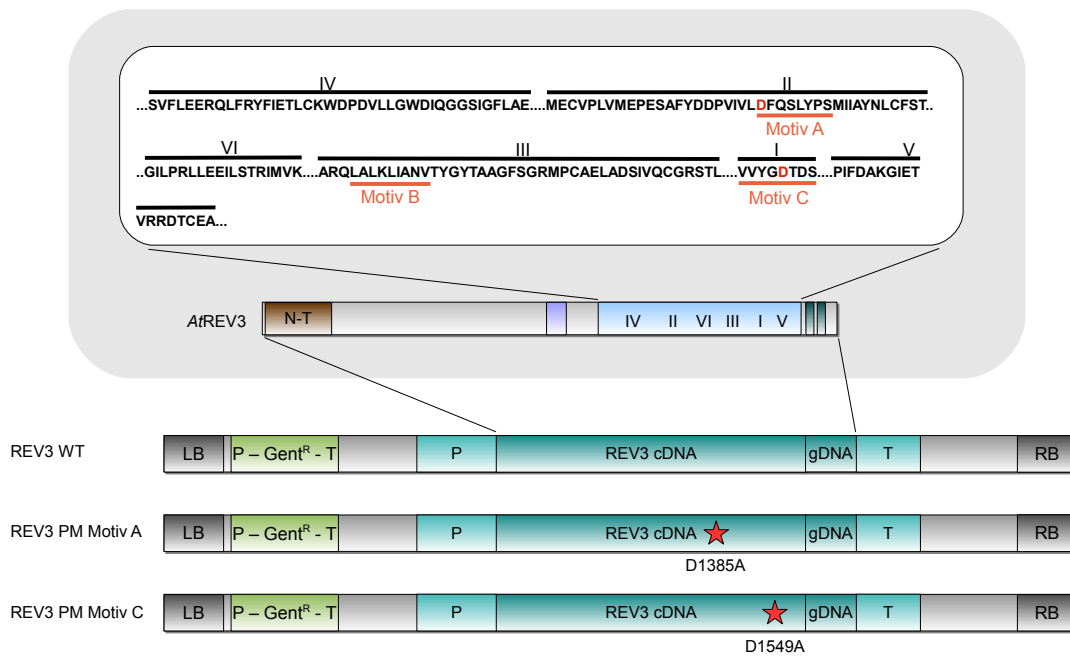
Da die inserierte T-DNA der *rev3-5*-Insertionslinie im Intron liegt, musste zwingend überprüft werden, ob diese eventuell durch Spleißen der prä-mRNA entfernt wurde. In der qRT-PCR wurden drei Primerpaare eingesetzt. Diese binden in 5'-Richtung der T-DNA, die T-DNA überspannend oder in 3'-Richtung der T-DNA-Insertion. In Abbildung 3.15 sind die gemittelten Ergebnisse der Expressionsanalysen aus drei unabhängigen biologischen Durchgängen dargestellt. In 5'-Richtung der T-DNA wurde eine zum Wildtyp vergleichbar starke Expression des Gens gemessen. Mit dem T-DNA überspannenden Primerpaar konnte nahezu keine (0,28%) Expression im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden, während in 3'-Richtung der Insertion kein Unterschied der Expression zu dem Wildtyp festgestellt werden konnte. Da mit der Primerkombination über die T-DNA-Insertionsstelle nahezu kein Produkt gebildet wurde, wurde die T-DNA nicht durch Spleißvorgänge entfernt. Ein Expressionsprodukt würde daher aufgrund der vorliegenden T-DNA-Insertion mit hoher Wahrscheinlichkeit kein funktionales Protein bilden.



**Abbildung 3.15: Quantitative Expressionsanalyse der *rev3-5*-Insertionslinie.** Das Expressionsniveau wurde mithilfe dreier verschiedener Primerkombinationen mittels quantitativer RT-PCR getestet. Die Primerpaare binden in 5'-Richtung der T-DNA-Insertion (A), überspannen diese im genomischen Bereich (B) oder binden in 3'-Richtung der Insertion (C). Die ungefähre Lage der Primerpaare ist im oberen Bildabschnitt mit Pfeilen gekennzeichnet. Diese binden stets in Exonbereichen des Gens. Die als Matrize verwendete cDNA wurde durch reverse Transkriptase unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern aus der isolierten Gesamt-RNA der Linien gewonnen. Die Expressionsdaten der Insertionslinien wurden auf die des *ACT1N2* Haushaltsgens normalisiert. Mit den Primerkombinationen A und C konnte keine veränderte Genexpression in der Insertionslinie im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. Über die T-DNA-Insertion (B) beträgt die Expression in der Insertionslinie 0,28 % des Wildtyps.

### 3.2.2 Komplementationsstudien mit REV3

Um die Funktionsweise von REV3 in *Arabidopsis* weiter zu untersuchen, wurden Komplementationsstudien durchgeführt. REV3 besitzt drei zwischen verschiedenen Organismen hoch konservierte Regionen: die N-terminale Domäne, die REV7-Bindedomäne sowie die Polymerasedomäne. Die Polymerasedomäne ist für die Katalyse der Polymerisierungsreaktionen notwendig und trägt sechs konservierte Regionen I - VI, dabei ist das Level der Konservierung bei Region I am höchsten und Region VI am niedrigsten. Anhand der Daten der Sequenzvergleiche aus Sakamoto *et al.*, 2003, sowie bereits Bekanntem zu der allgemeinen Funktionsweise von Polymerasen wurden zwei stark konservierte AS in der Polymerasedomäne von REV3 ausgewählt, welche durch Punktmutationen durch andere AS ausgetauscht wurden. Bei diesen AS handelt es sich um AS innerhalb der Motive A und C, welche an der Bildung des aktiven Zentrums des Proteins beteiligt sind. In Mutagenesestudien mit Phagen wurde gezeigt, dass die betroffene AS in Motiv A an der Polymerisierungsreaktion und die in Motiv C wahrscheinlich an Translokationsreaktionen beteiligt ist (Bernad *et al.*, 1990).

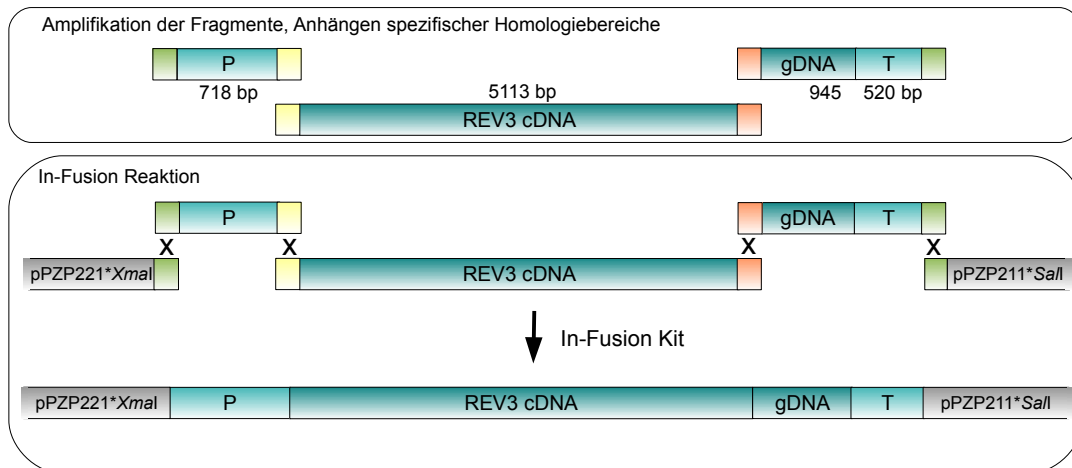


**Abbildung 3.16: Übersicht der verwendeten REV3 Komplementationskonstrukte.** Dargestellt ist eine schematische Übersicht über die verwendeten Komplementationskonstrukte. Das Wildtyp-Konstrukt wurde über In-Fusion Klonierung hergestellt (Abbildung 3.17). Es besteht zum vorderen Teil aus cDNA und zum hinteren Teil aus gDNA von REV3. Eingefasst sind cDNA und gDNA von dem natürlichen Promotor (P) und Terminator (T) des Gens. Die Expression des Konstruktes führt zu einem natürlichen REV3 Genprodukt. Innerhalb der Polymerasedomäne (hellblau) des Proteins liegen sechs stark konservierte Regionen I-VI, welche wiederum die für die Ausbildung des aktiven Zentrums des Proteins wichtigen Motive A, B und C enthalten. Die Punktmutationen tragenden Konstrukte wurden mittels zielgerichteter Mutagenese des Wildtyp-Konstrukt tragenden Plasmids hergestellt. Sie enthalten Punktmutationen in Motiv A beziehungsweise in Motiv C, wobei es sich jeweils um D→A Substitutionen handelt. Die betroffenen Asparaginsäuren sind im oberen Teil der Abbildung rot dargestellt. Zur Selektion erfolgreicher Transformationsereignisse und zur Etablierung von homozygoten *single locus*-Linien wurde die bereits in pZP221 vorhandene Gentamycin-Resistenzkassette (P - Gent<sup>R</sup> - T) genutzt. LB und RB grenzen die T-DNA ab, welche den in Pflanzen übertragenen Abschnitt des Vektors darstellt.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Komplementationsstudien wurde die *rev3-2*-Insertionslinie mit drei verschiedenen Konstrukten komplementiert (Abbildung 3.16). Bei dem ersten Konstrukt handelt es sich um ein Wildtyp-Konstrukt, welches das aus cDNA und gDNA kombinierte Genkonstrukt unter der Kontrolle des natürlichen Promotors und Terminators des Gens trägt. Als Terminator und Promotor wurden die genomischen Bereiche in 5'-Richtung (718 bp) und 3'-Richtung (945 bp) des Gens bis zu den jeweils angrenzenden Genen gewählt.

Die Verknüpfung der insgesamt drei Fragmente mit dem durch *Xma*I und *Sa*II linearisierten Plasmid pZP221 erfolgt über eine In-Fusion Reaktion (Abbildung 3.17). Hierfür wurden die einzelnen Fragmente zunächst über PCR amplifiziert. Als Matrize für das Promotor- (718 bp) und das 3'-ORF/Terminator gDNA-Fragment (1465 bp) diente genomische DNA aus Col-0, während für das größte, mittlere Fragment (5113 bp) aus Col-0 isolierte cDNA genutzt wurde. Durch die Verwendung von cDNA konnte statt mit der umfangreichen genomischen Sequenz von REV3 (9201 bp) mit kürzeren Sequenzen gearbeitet werden. Durch die zusätzliche Verwendung von gDNA enthielt das Konstrukt weiterhin Introns, welche nicht von Prokaryoten herausgespleißt werden können. Dadurch

konnte die, wenn auch unwahrscheinliche, Expression eines funktionellen Proteins in *E. coli* und *A. tumefaciens* ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.17: In-Fusion Reaktion zur Herstellung des REV3 Wildtyp-Komplementationskonstruktes.** Die Herstellung des Wildtyp-Komplementationskonstruktes bezüglich *REV3* erfolgte durch eine In-Fusion Reaktion. Hierfür wurden zunächst die drei einzelnen Fragmente durch PCR amplifiziert, wobei mittels Überhangprimern jeweils homologe Bereiche zu dem benachbarten Fragment beziehungsweise des geschnittenen Vektors angehängt wurden (dargestellt als gleichfarbige Rechtecke an den Enden der Fragmente). In der In-Fusion Reaktion wurden diese Homologiebereiche genutzt, um die Fragmente und den Vektor in der gewünschten Reihenfolge miteinander zu verknüpfen.

Für die Amplifikation der Fragmente wurden Überhangprimer genutzt, um homologe Sequenzbereiche in einer Länge von 15 bp zu den angrenzenden Fragmenten, beziehungsweise dem geschnittenen Plasmid, anzuhängen. In der darauf folgenden In-Fusion Reaktion werden diese Homologiebereiche genutzt, um die Fragmente in einem Schritt in gewünschter Reihenfolge mit dem geöffneten Plasmid zu verknüpfen. Weiterhin trägt der verwendete Ursprungsvektor pPZP221 innerhalb der T-DNA eine Gentamycin-Resistenzkassette, über welche die Selektion der erfolgreich transformierten Pflanzen und die Etablierung der homozygoten *single locus*-Linien möglich war. Das Konstrukt wurde innerhalb der MCS des Vektors eingefügt. Sein Expressionsprodukt entspricht dem Wildtyp-Protein REV3. Die beiden Punktmutationen tragenden Konstrukte wurden mittels zielgerichteter Mutagenese des Wildtyp-Konstrukt tragenden Plasmids hergestellt. Die dafür verwendeten Mutageneseprimer tragen mittig die gewünschte Aminosäuresubstitution (D1385A und D1549A). Die dadurch nach der Expression der mutierten Gene durch Alanin ausgetauschten Asparaginsäuren liegen innerhalb der stark konservierten Motive A und C von REV3, welche für die Ausbildung des aktiven Zentrums und somit für die Polymeraseaktivität des Proteins wichtig sind. Die so hergestellten Konstrukte wurden stabil in *Arabidopsis* transformiert und die etablierten homozygoten *single locus*-Linien für Sensitivitätstests verwendet. Dadurch sollte untersucht werden, wie sich das Fehlen dieser AS auf die Funktion von REV3 bei der Reparatur verschiedener Schäden auswirkt. Alle für die In-Fusion Reaktion und Mutagenesen verwendeten Primersequenzen sind dem Anhang (Tabelle A.2) zu entnehmen.



### Komplementationsstudien mit chemischen Agenzien

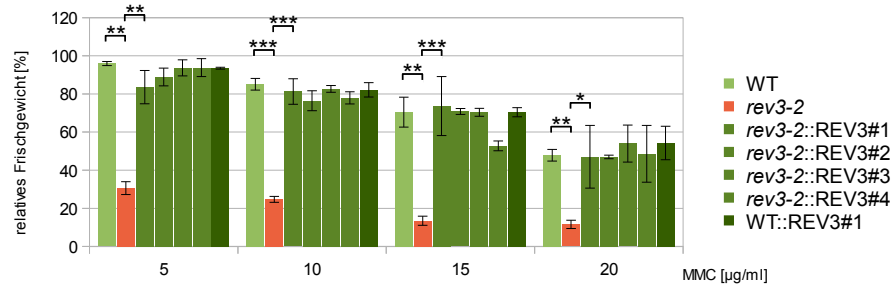
Zunächst wurde die *rev3-2*-Insertionslinie mit dem Wildtyp-Konstrukt transformiert. Dies diente der Kontrolle der Mutantenlinie sowie des klonierten Konstruktes. Da *rev3*-Mutantenlinien gegenüber den genotoxischen chemischen Agenzien MMC, MMS und Cisplatin hypersensitiv reagieren, wurden diese Agenzien für die Komplementationsstudien gewählt. Die Ergebnisse der Komplementationsstudien sind in Abbildung 3.18 dargestellt. Dabei bezeichnen *rev3-2::REV3*#1 - #4 Komplementationslinien mit unterschiedlichen Integrationsorten des Konstruktes in der Mutantenlinie *rev3-2*. Die Linie WT::*REV3*#1 diente als zusätzliche Kontrolle, hierbei wurde das Konstrukt in die Wildtyp-Linie transformiert. Die signifikante Hypersensitivität von *rev3-2* konnte für alle drei getesteten Genotoxine bestätigt werden. Dabei ist die Hypersensitivität gegenüber MMC und Cisplatin im Vergleich zum Wildtyp stärker ausgeprägt als die gegenüber niedrigen Konzentrationen (40 und 60 ppm) MMS. Das relative Frischgewicht der Insertionslinie beträgt bei der jeweils geringsten Genotoxinkonzentration bei MMC etwa 30 %, bei MMS etwa 80 % und bei Cisplatin etwa 40 % des Wildtyps. Dieses Verhältnis ändert sich bei höheren MMC- und Cisplatin-Konzentrationen nicht merklich. Bei höheren MMS-Konzentrationen (80 und 100 ppm) zeigt die Insertionslinie jedoch ebenfalls eine starke Hypersensitivität im Vergleich zum Wildtyp. Das relative Frischgewicht beträgt hier bei 80 ppm circa 35 % und bei 100 ppm circa 20 % des Wildtyps. Die Hypersensitivitäten gegenüber allen drei Genotoxinen können mit den vier verschiedenen *rev3-2*-Komplementationslinien aufgehoben werden. Die Kontrolle WT::*REV3*#1 verhält sich gegenüber den Genotoxinen wie der Wildtyp.

Nach dem Test der Funktionalität des Wildtyp-Konstruktes in der Insertionslinie *rev3-2* erfolgten die Komplementationsstudien mit den Punktmutation tragenden Konstrukten. Wie bei den Versuchen mit dem Wildtyp-Konstrukt wurden MMC, MMS und Cisplatin als Genotoxine gewählt. Die Ergebnisse der Komplementationsstudien mit dem Punktmutation tragenden Konstrukt in Motiv A sind in Abbildung 3.19 dargestellt. Bei allen vier Komplementationslinien mit der T-DNA Insertionsmutante als Ursprungslinie (*rev3-2::REV3* D1385A#1 - #4) führt die Mutation in Motiv A der Polymerasedomäne zur gleichen Sensitivität gegenüber MMC, MMS und Cisplatin wie bei *rev3-2*. Die Transformation des Punktmutation tragenden Konstruktes in den Wildtyp (WT::*REV3* D1385A#1) führt zu keiner Veränderung der Sensitivität der Linie im Vergleich zum Wildtyp.

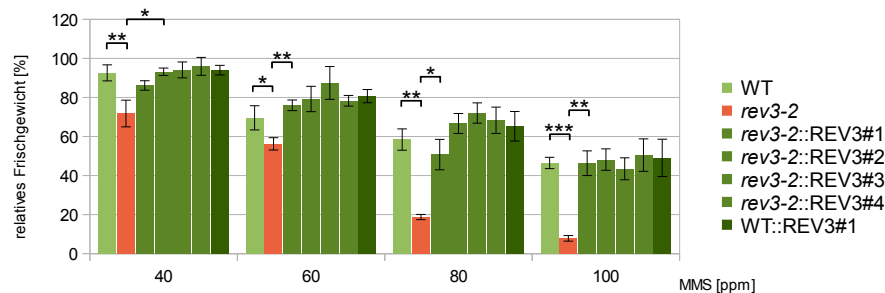
Die Ergebnisse der Komplementationsstudien mit dem Punktmutation tragenden Konstrukt in Motiv C sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Hier zeigt sich ein anderes Ergebnis als bei den Versuchen mit dem Punktmutation in Motiv A tragenden Konstrukt. Hier verhält sich die Linie *rev3-2::REV3* D1549A#1 bei allen getesteten Genotoxinen und Konzentrationen wie die *rev3-2*-Insertionslinie. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde mittels PCR-Analyse bestätigt, dass das Konstrukt vollständig in das Genom der *rev3-2*-Insertionslinie inseriert wurde (nicht gezeigt). Die Linien *rev3-2::REV3* D1549A#2 - #4 zeigen bei der Behandlung mit MMC einen intermediären Phänotyp, dies ist vor allem bei der niedrigsten MMC-Konzentration (5 µg/ml) signifikant. Bei Behandlung mit höheren MMC-Konzentrationen gleichen sich die relativen Frischgewichte der *rev3-2*-Insertionslinie und der



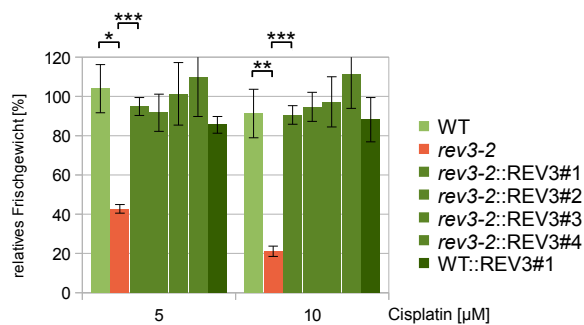
## Frischgewicht nach MMC-Behandlung



## Frischgewicht nach MMS-Behandlung



## Frischgewicht nach Cisplatin-Behandlung

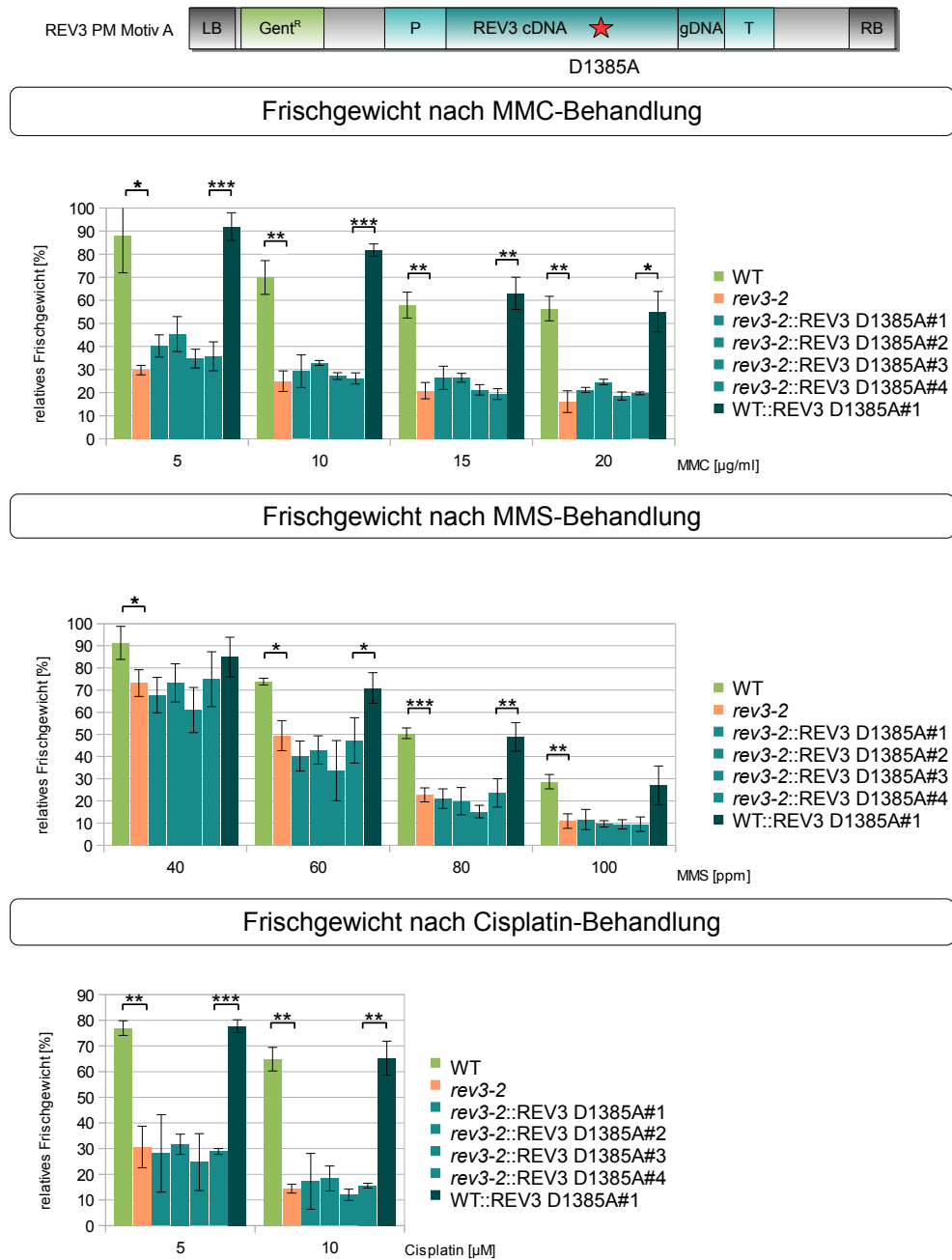


**Abbildung 3.18: Komplementationsstudien von *rev3-2* mit dem Wildtyp-Konstrukt.** Die Insertionslinie zeigt wie erwartet Hypersensitivitäten gegenüber der Genotoxine MMC, MMS und Cisplatin, wobei die Hypersensitivität gegenüber MMC und Cisplatin im Vergleich zum Wildtyp stärker ist als gegenüber geringen MMS-Konzentrationen. Das relative Frischgewicht der Insertionslinie beträgt bei der jeweils geringsten Genotoxinkonzentration bei MMC etwa 30 %, bei MMS etwa 80 % und bei Cisplatin etwa 40 % des Wildtyps. Dieses Verhältnis ändert sich bei höheren MMC- und Cisplatin-Konzentrationen nicht merklich. Im Gegensatz dazu beträgt das relative Frischgewicht der *rev3-2*-Insertionslinie bei höheren MMS-Konzentrationen lediglich etwa 35 % (80 ppm) beziehungsweise 20 % (100 ppm) des Wildtyps. Die vier Komplementationslinien mit unterschiedlichen Integrationsorten des Komplementationskonstrukt (*rev3-2::REV3#1 - #4*) zeigen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Sensitivität bei allen getesteten Genotoxinen und Konzentrationen. Bei der Linie WT::REV3#1 handelt es sich um eine Kontroll-Linie. Hier wurde das Konstrukt in die Wildtyp-Linie transformiert. Auch diese Linie weist keinen Unterschied in ihrer Sensitivität zum Wildtyp auf. Die Säulen stellen die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte. Signifikanzniveaus wurden mit Klammern über den jeweiligen Balken gekennzeichnet ( $p < 0,001$ : \*\*\*,  $0,01 > p > 0,001$ : \*\*,  $0,05 > p > 0,01$ : \*).

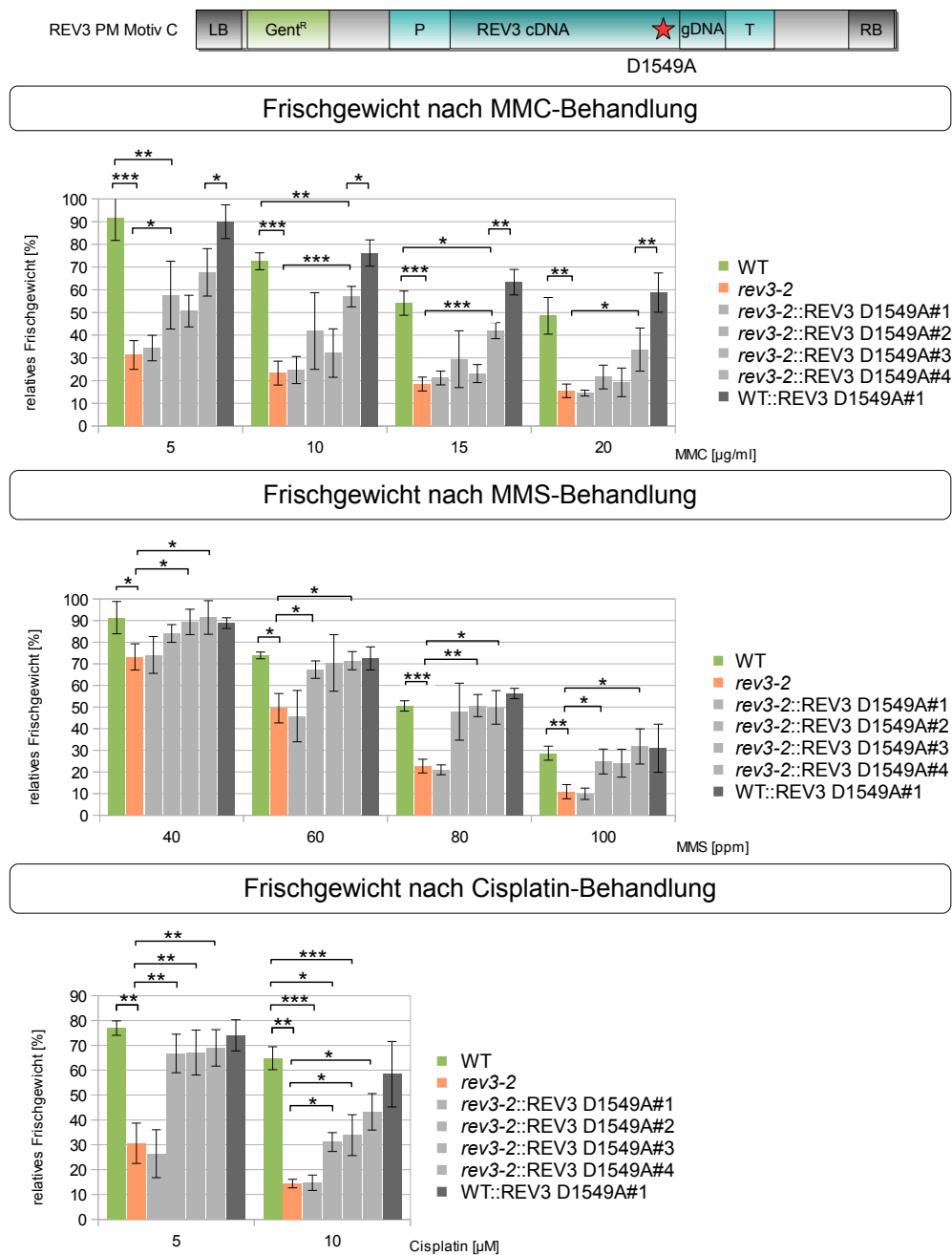
Komplementationslinien *rev3-2::REV3* D1549A#2 - #4 an, wodurch der signifikante Unterschied nur noch für *rev3-2::REV3* D1549A#3 nachweisbar ist. Die Behandlung mit MMS führte zur Aufhebung der Hypersensitivität der *rev3-2*-Insertionslinie bei den Linien *rev3-2::REV3* D1549A#2 - #4. Bei der Behandlung mit Cisplatin ist selbiges für eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  der Fall, während die Linien bei 10  $\mu\text{M}$  einen zwischen Wildtyp und *rev3-2* signifikant intermediären Phänotyp aufweisen. Die Kontrolllinie WT::*REV3* D1549A#1 verhält sich in allen Fällen wie der Wildtyp.

### Komplementationsstudien mit UV-B Bestrahlung

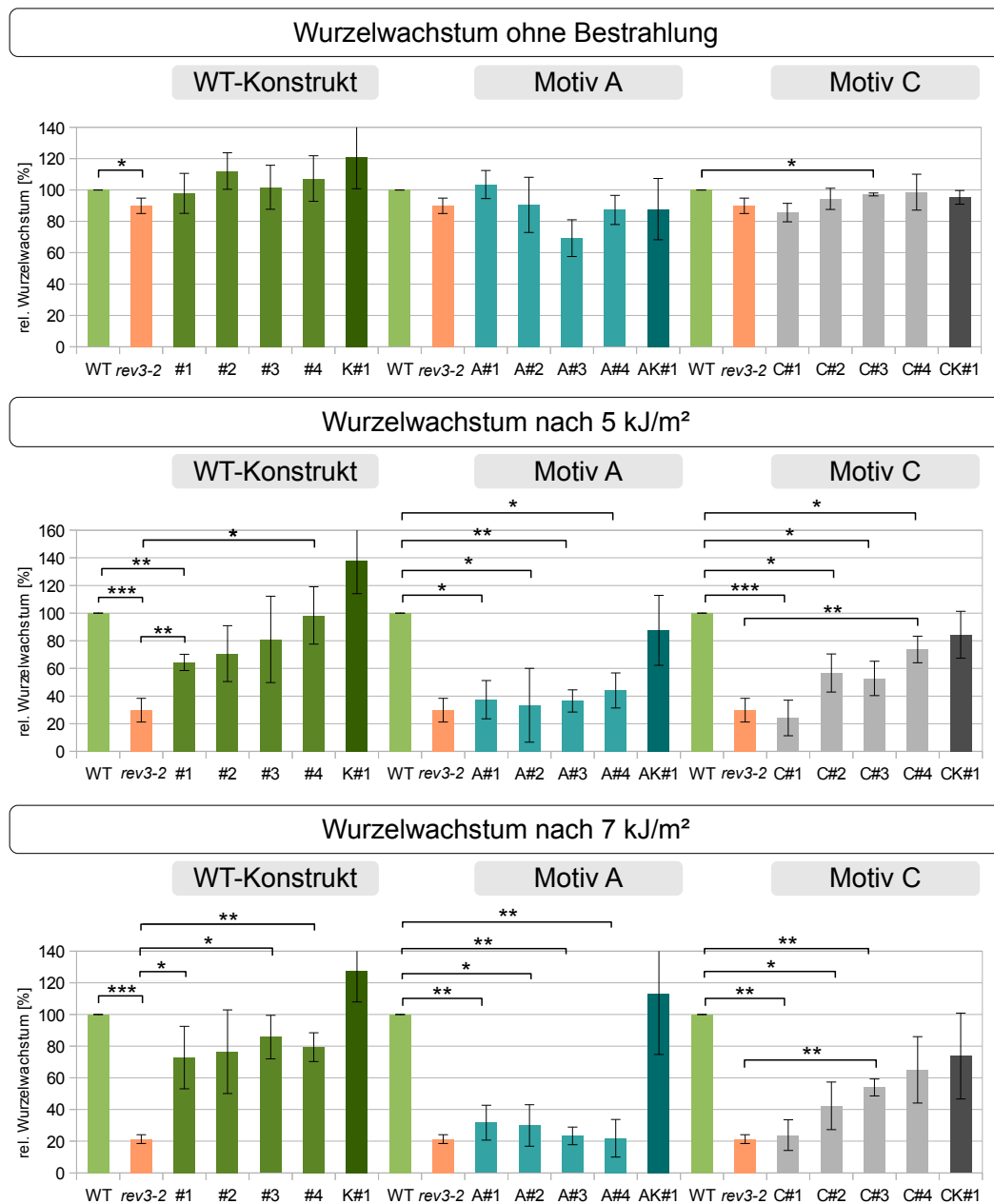
Zusätzlich zu den Komplementationsstudien mit chemischen genotoxischen Agenzien wurden diese auch mit UV-B-Bestrahlung durchgeführt. Hierfür wurden die Keimlinge unter sterilen Bedingungen auf quadratische, mit GM Festmedium gefüllte Platten ausgebracht, welche senkrecht aufgestellt für drei Tage inkubiert wurden. Nach der Bestrahlung mit 0, 5 und 7  $\text{kJ}/\text{m}^2$  wurden die Platten für einen Tag in Alufolie gehüllt, diese anschließend entfernt und die Pflanzen weitere sechs Tage inkubiert. Daraufhin erfolgte die Fotodokumentation und Vermessung der Wurzellängen von jeweils sechs Pflanzen pro Linie. Die Ergebnisse der Bestrahlungen aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen sind in Abbildung 3.21 dargestellt. Im unbestrahlten Zustand zeigen die Wurzeln der *rev3-2* Insertionslinie ein geringfügig kürzeres Wurzelwachstum als der Wildtyp. Die restlichen Linien verhalten sich ähnlich wie der Wildtyp. Nach 5 und 7  $\text{kJ}/\text{m}^2$  weist die Insertionslinie *rev3-2* wie erwartet ein im Vergleich zum Wildtyp stark reduziertes Wurzelwachstum auf. Dieses beträgt bei 5  $\text{kJ}/\text{m}^2$  circa 30 % und bei 7  $\text{kJ}/\text{m}^2$  circa 20 % des Wildtyps. Die Sensitivität der Mutante kann durch Expression des Wildtyp-Konstruktes in den Linien *rev3-2::REV3*#1 - #4 komplementiert werden. Die Linie WT::*REV3*#1, welche das Wildtyp-Komplementationskonstrukt im Wildtyp-Hintergrund trägt, weist bei beiden UV-B Intensitäten ein im Vergleich zum Wildtyp um circa 30% besseres Wurzelwachstum auf. Für die mit den Punktmutationen in Motiv A und Motiv C tragenden Konstrukten transformierten Linien *rev3-2::REV3* D1385A#1 - #4 sowie *rev3-2::REV3* D1549A#1 - #4 zeigt sich ein ähnliches Bild wie nach Behandlung mit chemischen genotoxischen Agenzien. Die UV-B-Sensitivität der *rev3-2* Insertionslinie kann nicht durch die Punktmutation in Motiv A tragende Konstrukt komplementiert werden, die Linie WT::*REV3* D1385A#1 verhält sich wie der Wildtyp. Die Expression des Konstruktes mit Punktmutation in Motiv C führt hingegen bei den Linien *rev3-2::REV3* D1549A#1 - #4 zu einer teilweisen Aufhebung der Sensitivität der Insertionslinie, während sich die Linie *rev3-2::REV3* D1549A#1 wie bei den Tests mit chemischen genotoxischen Agenzien in ihrer Sensitivität nicht von *rev3-2* unterscheidet. Die Kontrolllinie WT::*REV3* D1549A#1 weist keine Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp auf.



**Abbildung 3.19: Komplementationsstudien von *rev3-2* mit einem Punktmutation in Motiv A tragenden Konstrukt.** Getestet wurden vier Komplementationslinien mit *rev3-2* als Ursprungslinie (*rev3-2*::REV3 D1385A#1 - #4) und eine Komplementationslinie mit dem Wildtyp als Ursprungslinie (AK#1) im Vergleich zu der Insertionslinie *rev3-2* und dem Wildtyp. Aufgeführt ist jeweils das zur unbehandelten Probe relative Frischgewicht nach MMC-, MMS- und Cisplatin-Behandlung der Pflanzen. Bei allen getesteten Genotoxinen und Konzentrationen wird die in *rev3-2* vorhandene Hypersensitivität bei den Linien *rev3-2*::REV3 D1385A#1 - #4 nicht durch das Einbringen des Punktmutationskonstruktes aufgehoben. Das relative Frischgewicht in den Komplementationslinien sowie der *rev3-2*-Insertionslinie beträgt nach MMC-Behandlung je nach zugegebener Konzentration zwischen 25 und 35 %, nach MMS-Behandlung zwischen 50 und 80 % und nach Cisplatin-Behandlung zwischen 25 und 35 % des Wildtyps. Die Linie WT::REV3 D1385A#1 zeigt hingegen keinen Unterschied zu der Sensitivität des Wildtyps. Die Säulen stellen die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte. Signifikanzniveaus wurden mit Klammern über den jeweiligen Balken gekennzeichnet ( $p < 0,001$ : \*\*\*,  $0,01 > p > 0,001$ : \*\*,  $0,05 > p > 0,01$ : \*).



**Abbildung 3.20: Komplementationsstudien von *rev3-2* mit einem Punktmutation in Motiv C tragenden Konstrukt.** Getestet wurden vier Komplementationslinien mit *rev3-2* als Ursprungslinie (*rev3-2::REV3 D1549A#1 - #4*) und eine Komplementationslinie mit dem Wildtyp als Ursprungslinie (WT::*REV3 D1549A#1*) im Vergleich zu der Insertionslinie *rev3-2* und dem Wildtyp. Aufgeführt ist jeweils das zur unbehandelten Probe relative Frischgewicht nach MMC-, MMS- und Cisplatin-Behandlung der Pflanzen. Die Komplementationslinie *rev3-2::REV3 D1549A#1* verhält sich für alle getesteten Genotoxine und Konzentrationen wie *rev3-2*. Das Frischgewicht dieser Linien beträgt je nach Konzentration nach MMC-Behandlung zwischen 25 und 40 %, nach MMS-Behandlung zwischen 50 und 85 % und nach Cisplatin-Behandlung zwischen 25 und 40 % des Wildtyps. Nach Behandlung mit MMC konnte bei der Konzentration 5 µg/ml bei den Linien *rev3-2::REV3 D1549A#2 - #4* ein intermediärer Phänotyp festgestellt werden, welcher bei höheren Konzentrationen aufgehoben wird. Die Sensitivität von *rev3-2* gegenüber MMS konnte bei allen getesteten Konzentrationen durch das Punktmutation tragende Konstrukt in den Linien *rev3-2::REV3 D1549A#2 - #4* aufgehoben werden. Selbiges gilt für die geringere der beiden getesteten Cisplatin-Konzentrationen (5 µM). Nach Behandlung mit 10 µM konnte für die Linien *rev3-2::REV3 D1549A#2 - #4* ein zwischen Wildtyp und Insertionslinie intermediärer Phänotyp nachgewiesen werden. Die Säulen stellen die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Wiederholungen dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte. Signifikanzniveaus wurden mit Klammern über den jeweiligen Balken gekennzeichnet ( $p < 0,001$ : \*\*\*,  $0,01 > p > 0,001$ : \*\*,  $0,05 > p > 0,01$ : \*).



**Abbildung 3.21: Wurzelwachstum der Komplementationslinien von *rev3-2* nach UV-B Bestrahlung.**

Getestet wurden der Wildtyp, die *rev3-2* Insertionslinie sowie die Komplementationslinien bezüglich des Wildtyp-Konstruktes (*rev3-2::REV3*#1 - #4 und WT::*REV3*#1, in der Abbildung #1 - #4 und K#1), des Punktmutation in Motiv A tragenden Konstruktes (*rev3-2::REV3* D1385A#1 - #4, WT::*REV3* D1385A#1, in der Abbildung A#1 - A#4 und AK#1) sowie des Punktmutation in Motiv C tragenden Konstruktes (*rev3-2::REV3* D1549A#1 - #4, WT::*REV3* D1549A#1, in der Abbildung C#1 - C#4 und CK#1) auf ihr Wurzelwachstum ohne und nach UV-B Bestrahlung. Die Bestrahlung erfolgte bei einer Wellenlänge von 312 nm in den Dosen 5 und 7 kJ/m<sup>2</sup>. Die Auswertung der mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgänge erfolgte relativ zum Wachstum des Wildtyps. Ohne UV-B Bestrahlung war nur ein geringfügig kürzeres Wurzelwachstum bei der Insertionslinie festzustellen, während kein deutlicher Unterschied zwischen den Wurzellängen des Wildtyps und den Komplementationslinien vorlag. Durch die Expression des Wildtyp-Konstruktes kann die Sensitivität der *rev3-2* Insertionslinie nach UV-B Bestrahlung aufgehoben werden (*rev3-2::REV3*#1 - #4). Die Linie WT::*REV3*#1 trägt das Wildtyp-Konstrukt im Wildtyp-Hintergrund und zeigt nach Bestrahlung ein im Vergleich zum Wildtyp weniger gemindertes Wurzelwachstum. Die Expression des Punktmutation in Motiv A tragenden Konstruktes kann die Sensitivität von *rev3-2* nicht aufheben. Die Expression des Punktmutation in Motiv C tragenden Konstruktes führt bei den Linien *rev3-2::REV3* D1549A#2 - #4 zu einer teilweisen Komplementation der Sensitivität, während *rev3-2::REV3* D1549A#1 keinen Unterschied zu *rev3-2* aufweist. Die Säulen stellen die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte. Signifikanzniveaus wurden mit Klammern über den jeweiligen Balken gekennzeichnet ( $p < 0,001$ : \*\*\*,  $0,01 > p > 0,001$ : \*\*,  $0,05 > p > 0,01$ : \*).

### 3.2.3 REV3 und Faktoren der pflanzlichen DNA-Reparatur

REV3-defiziente *Arabidopsis*-Linien reagieren hypersensitiv gegenüber verschiedenen DNA-schädigenden Agenzien. Dazu gehören die Crosslink verursachenden Agenzien MMC und Cisplatin, aber auch das alkylierende Agens MMS. Auch andere an der Reaktion auf die genannten Schäden wichtige Faktoren sind in *Arabidopsis* bekannt. Die Endonuklease MUS81 ist beispielsweise ebenfalls in die Reparatur von MMC, Cisplatin und MMS induzierten DNA-Schäden involviert. Der RecQ-Helikase RECQ4A konnte eine Rolle in der Reparatur von MMS und Cisplatin induzierten Schäden, jedoch keine direkte Rolle bei der Reparatur von MMC induzierten Schäden zugeschrieben werden. Doppelmutanten von *mhf1* und *recq4a* sowie *fancm* und *recq4a* im Gegensatz zu den Einzelmутanten hypersensitiv gegenüber MMC reagieren (Dangel *et al.*, 2014). Ein weiterer wichtiger Reparaturfaktor ist RAD5A. RAD5A-defiziente Pflanzen reagieren hypersensitiv auf MMC, Cisplatin und in einem geringeren Maß auf MMS (Chen *et al.*, 2008a). Doppelmutantenanalysen von MUS81, RECQ4A und RAD5A zeigten, dass diese an unterschiedlichen DNA-Reparaturwegen beteiligt sind (Mannuss *et al.*, 2010). RAD5A und REV3 arbeiten im Bezug auf die Reaktion von MMS, UV-B-Strahlung, Cisplatin und MMC in alternativen Reparaturwegen (Wang *et al.*, 2011). Um einen Zusammenhang zwischen den Faktoren MUS81 und RECQ4A zu REV3 herzustellen, wurden in dieser Arbeit *rev3 mus81-1* sowie *rev3 recq4a-4* Doppelmutanten etabliert und Sensitivitätstests unterzogen.

Außerdem wurde das Zusammenspiel von REV3 mit der Checkpointkinase ATR untersucht. Es ist bekannt, dass ATR vornehmlich durch UV-induzierte Schäden, einzelsträngige DNA-Abschnitte und blockierte Replikationsgabeln aktiviert wird. Zu diesem Zweck wurden *rev3 atr-2* Doppelmutanten etabliert und Sensitivitätstests durchgeführt.

#### REV3, RECQ4A und MUS81 in der DNA-Reparatur von *Arabidopsis*

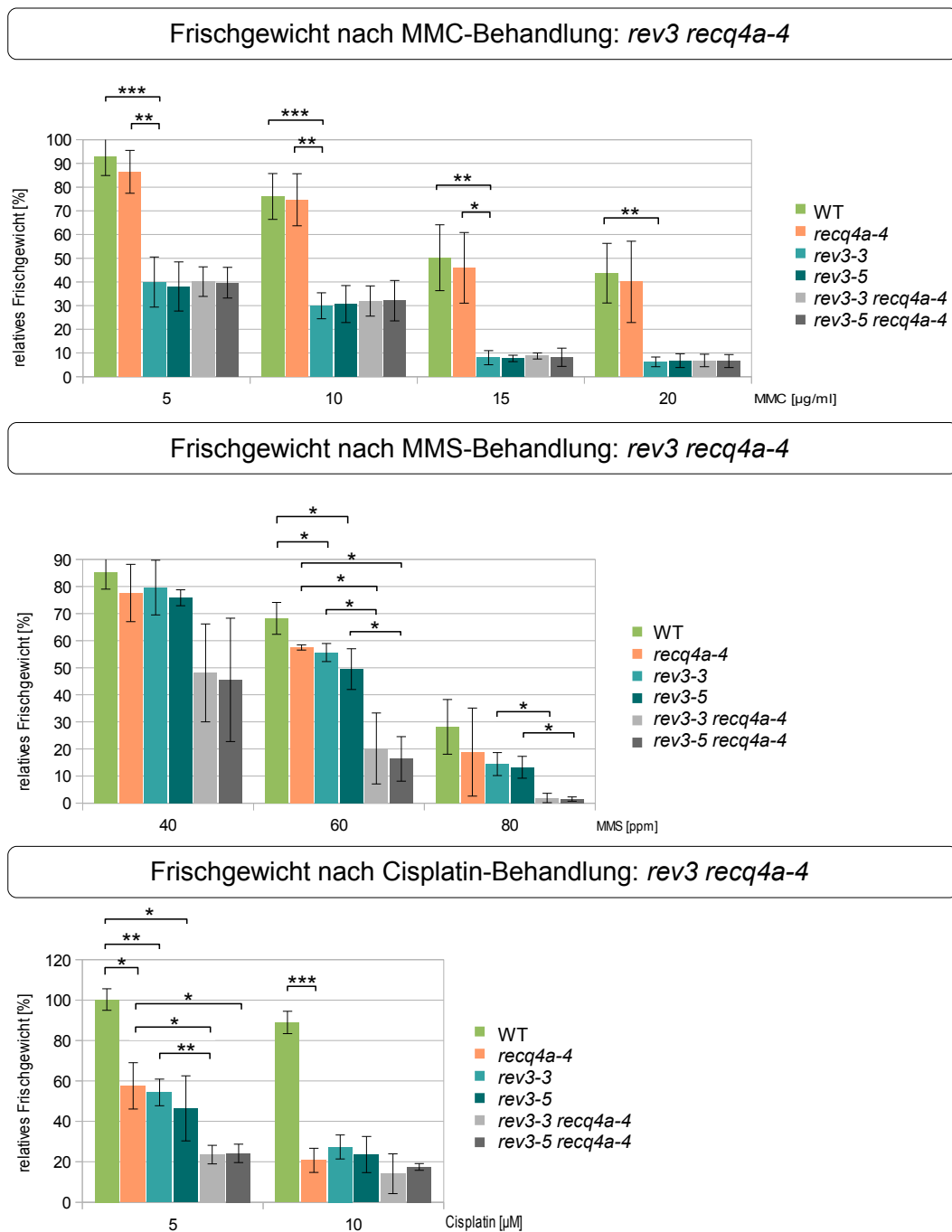
Zur Einordnung von REV3 in die voneinander unabhängigen, durch RECQ4A und MUS81 vertretenen Reparaturwege, wurden Doppelmutantenstudien durchgeführt. Die etablierten Doppelmutanten *rev3-3 recq4a-4*, *rev3-5 recq4a-4*, *rev3-3 mus81-1* und *rev3-5 mus81-1* wurden mit verschiedenen Konzentrationen der genotoxischen Agenzien MMC, MMS und Cisplatin behandelt und ihr Frischgewicht mit dem des Wildtyps und der jeweiligen Einzelmутanten verglichen. Die Auswertung der mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgänge erfolgte relativ zu den mitgeführten unbehandelten Pflanzen jeder Linie.

Die Ergebnisse der Sensitivitätstests der Doppelmutanten *rev3-3 recq4a-4* und *rev3-5 recq4a-4* sind in der Abbildung 3.22 dargestellt. Wie erwartet zeigt die *recq4a-4* Einzelmутante keine Hypersensitivitäten gegenüber MMC. Die Hypersensitivitäten der beiden *rev3 recq4a-4*-Doppelmutantenlinien entspricht denen der *rev3* Einzelmутanten, welche wiederum keine signifikanten Unterschiede zueinander aufweisen. Ein anderes Bild ergibt sich bei den Ergebnissen der Sensitivitätstests mit dem alkylierenden Agens MMS. Die *rev3* und *recq4a-4* Einzelmутanten zeigen wie erwartet leichte Hypersensitivitäten, welche vor allem bei der Konzentration von 60 ppm MMS deutlich sind. Die beiden Doppelmutantenlinien *rev3-3 recq4a-4* und *rev3-5 recq4a-4* weisen noch stärkere Hypersen-

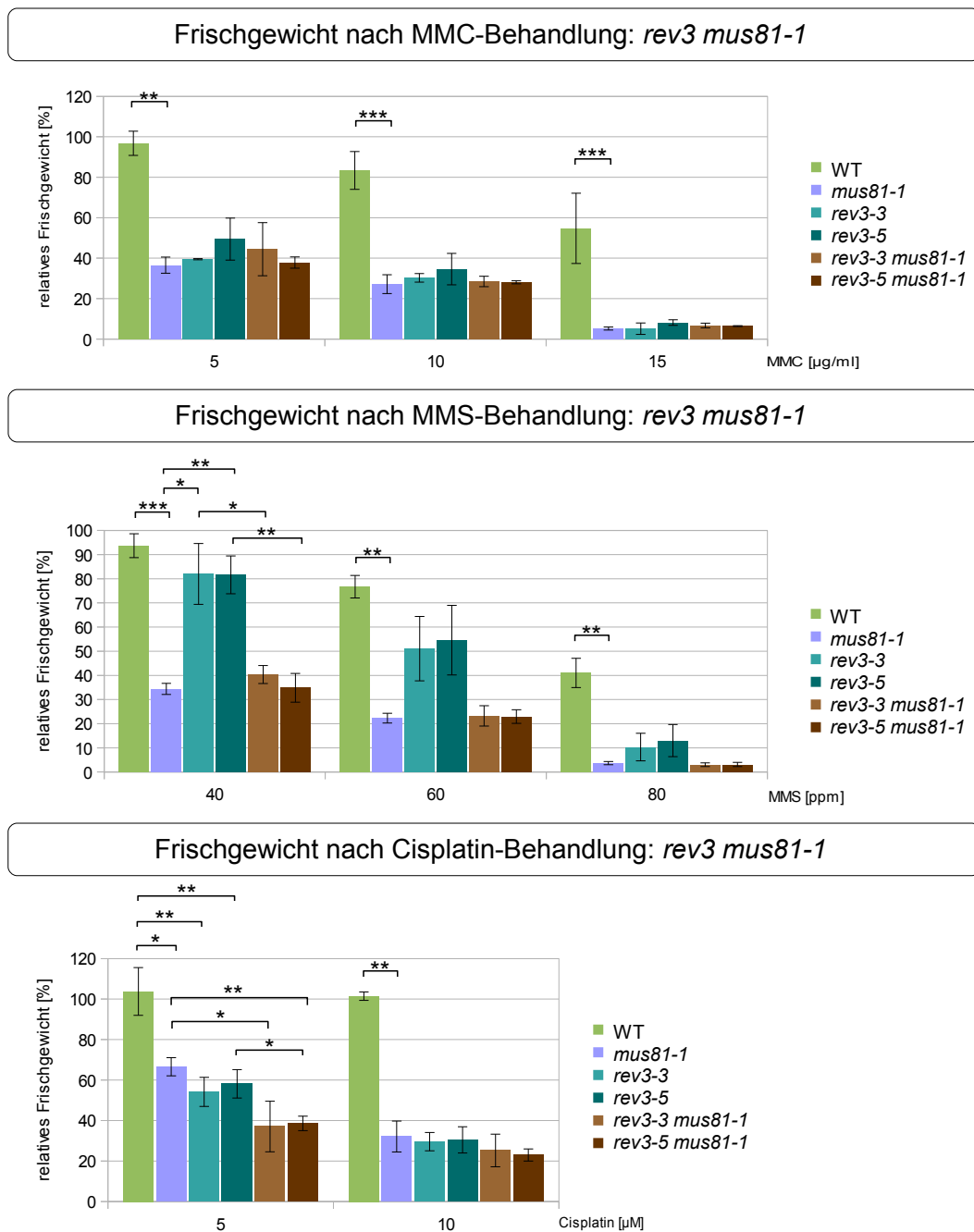
sitivitäten als die Einzelmutanten der Gene auf. Ähnlich verhalten sich die Einzel- und Doppelmutanten bezüglich ihrer Hypersensitivitäten gegenüber dem Crosslink verursachenden Agens Cisplatin. Deutlich zeigt sich das vor allem bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M Cisplatin und der *rev3-3 recq4a-4*-Doppelmutante. Hier beträgt das gemittelte relative Frischgewicht der Doppelmutante etwa 50% des Gewichts der beiden jeweiligen Einzelmutanten. Diese weisen beide gleich starke Hypersensitivitäten gegenüber Cisplatin auf.

Die Abbildung 3.23 zeigt die Ergebnisse der Sensitivitätstests mit den Doppelmutanten *rev3-3 mus81-1* und *rev3-5 mus81-1*. Nach Behandlung mit MMC zeigen die *rev3*-Insertionslinien und *mus81-1* vergleichbare Hypersensitivitäten gegenüber dem Agens, das Frischgewicht beträgt bei der geringsten verwendeten MMC-Konzentration (5  $\mu$ g/ml) etwa 40 - 50 % des Gewichts des Wildtyps. Die *rev3-3 mus81-1* und *rev3-5 mus81-1* Doppelmutanten weisen keine von den Einzelmutanten abweichende Sensitivität auf. Nach der MMS-Behandlung zeigt die Insertionslinie *mus81-1* ein deutlich schlechteres Wachstum als die beiden *rev3*-Insertionslinien, welche wie erwartet nur eine schwache Hypersensitivität aufweisen. Die Doppelmutantenlinien *rev3-3 mus81-1* und *rev3-5 mus81-1* verhalten sich bezüglich ihrer Sensitivitäten gegenüber MMS wie *mus81-1*. Nach Behandlung mit Cisplatin weisen die *rev3*-Insertionslinien und *mus81-1* ebenfalls eine miteinander vergleichbar starke Sensitivität auf. Bei 5  $\mu$ M Cisplatin konnte für die beiden Doppelmutanten ein geringfügig niedrigeres relatives Frischgewicht als für die Einzelmutanten festgestellt werden.





**Abbildung 3.22: Reparatur/Toleranz von DNA-Schäden in *rev3 recq4a-4* Doppelmutanten.** Getestet wurden die Doppelmutanten *rev3-3 recq4a-4* und *rev3-5 recq4a-4* im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten und dem Wildtyp auf verschiedene Konzentrationen der Agenzien MMC, MMS und Cisplatin. Die Insertionslinie *recq4a-4* zeigt keine Hypersensitivität gegenüber MMC, während die *rev3*-Insertionslinien ein vergleichbar stark vermindertes Frischgewicht (45 % bei 5 µg/ml - 20 % bei 20 µg/ml) im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Die beiden *rev3 recq4a-4* Doppelmutanten verhalten sich wie die entsprechende *rev3* Einzelmutante. Die MMS-Konzentration von 60 ppm zeigt, dass sich die Hypersensitivitäten der Einzelmutanten nicht voneinander unterscheiden, wohingegen das Frischgewicht der beiden Doppelmutanten deutlich geringer als das der Einzelmutanten ist. Am deutlichsten zeigen sich diese Verhältnisse bei 60 ppm MMS. Das Frischgewicht der Einzelmutanten beträgt hier etwa 80 % und das der Doppelmutanten etwa 25 % des Wildtyps. Die *rev3* und *recq4a-4* Einzelmutanten weisen mit dem Wildtyp vergleichbar starke Hypersensitivitäten gegenüber Cisplatin auf. Nach Behandlung mit 5 µM Cisplatin zeigen die Doppelmutanten ein geringeres relatives Frischgewicht (circa 50 %) im Vergleich zum Wildtyp als die jeweiligen Einzelmutanten (circa 20 %). Die Säulen stellen die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte. Signifikanzniveaus wurden mit Klammern über den jeweiligen Balken gekennzeichnet ( $p < 0,001$ : \*\*\*,  $0,01 > p > 0,001$ : \*\*,  $0,05 > p > 0,01$ : \*).

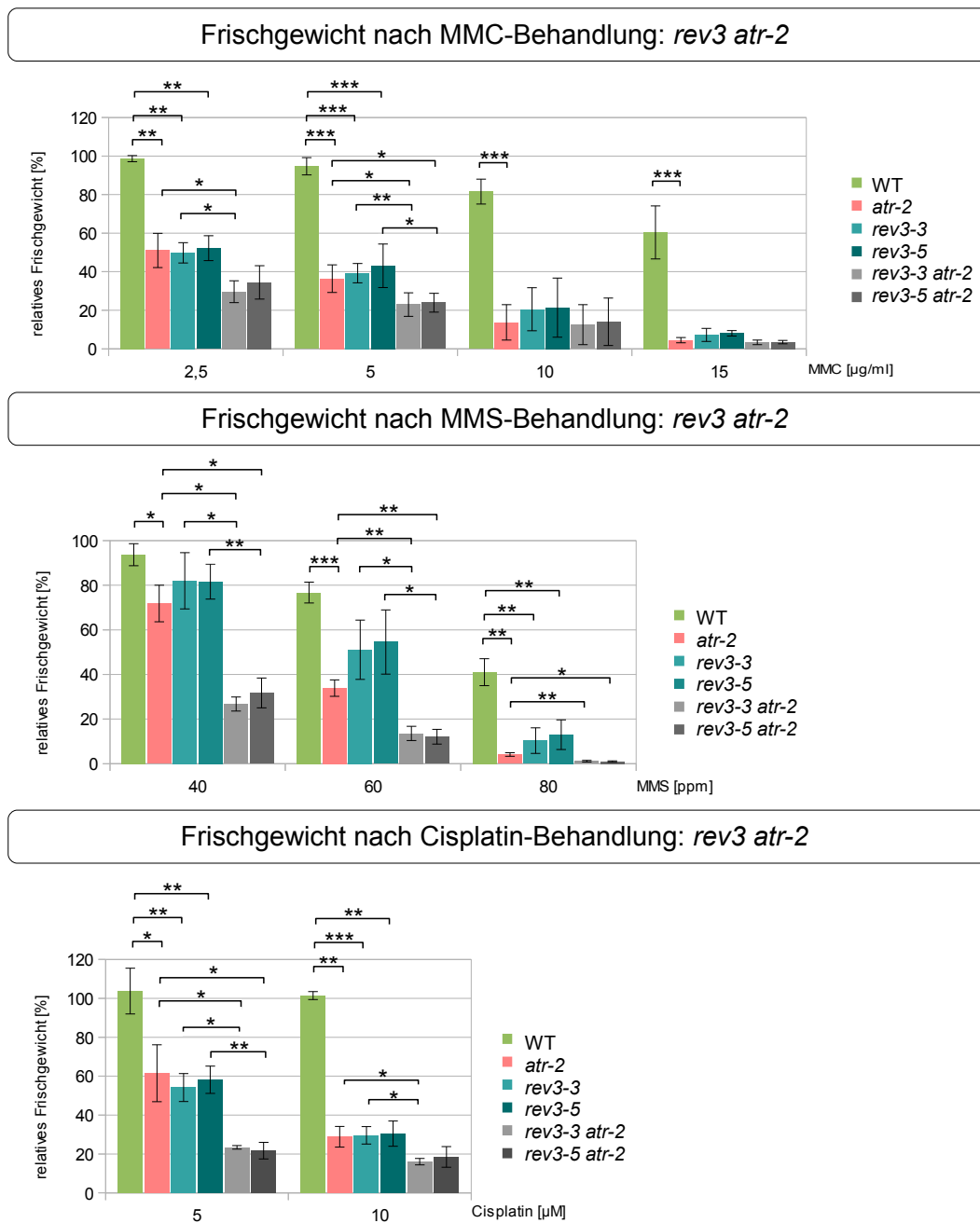


**Abbildung 3.23: Reparatur/Toleranz von DNA-Schäden in *rev3 mus81-1* Doppelmutanten.** Getestet wurden die Doppelmutanten *rev3-3 mus81-1* und *rev3-5 mus81-1* im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten und dem Wildtyp auf verschiedene Konzentrationen der Agenzien MMC, MMS und Cisplatin. Die beiden *rev3*-Insertionslinien sowie die *mus81-1* Einzelmutante weisen miteinander vergleichbare Hypersensitivitäten gegenüber MMC auf. Das relative Frischgewicht der Doppelmutanten unterscheidet sich nicht von dem der Einzelmutanten und liegt je nach Konzentration zwischen 20 und 40 % des Wildtyps. Nach MMS-Behandlung zeigen die *rev3*-Insertionslinien im Vergleich zu *mus81-1* nur eine geringe Hypersensitivität. Am deutlichsten zeigen sich die Unterschiede bei 60 ppm MMS. Das Frischgewicht der *rev3*-Insertionslinien beträgt circa 40 % des Wildtyps. Die beiden Doppelmutanten unterscheiden sich in ihrer Sensitivität nicht von der *mus81-1* Einzelmutante, deren Frischgewicht etwa 25 % des Wildtyps beträgt. Nach der Behandlung mit 5 µM Cisplatin weisen die *rev3* sowie die *mus81-1* Einzelmutanten eine vergleichbar starke Sensitivität auf, während die beiden Doppelmutanten eine im Vergleich dazu geringfügig erhöhte Sensitivität zeigen. Das Frischgewicht der Einzelmutanten beträgt relativ zum Wildtyp etwa 60 % und das der Doppelmutanten etwa 40 %. Die Säulen stellen die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte. Signifikanzniveaus wurden mit Klammern über den jeweiligen Balken gekennzeichnet ( $p < 0,001$ : \*\*\*,  $0,01 > p > 0,001$ : \*\*,  $0,05 > p > 0,01$ : \*).

### Das Zusammenspiel von REV3 und ATR in der Reaktion auf DNA-Schäden

Die beiden Zellzyklus Checkpoint-Kinasen ATM und ATR gehören zu den wichtigsten Initiatoren der zellulären Stressantwort. Sie werden durch DNA-Schäden aktiviert und phosphorylieren daraufhin zahlreiche nachgestellte Komponenten der Schadensreparatur und Faktoren des Zellzyklus. ATM wird hauptsächlich durch DSBs und ATR vornehmlich durch UV-induzierte Schäden, ssDNA-Abschnitte und bei Replikationsstress aktiviert. Durch Doppelmutantenanalysen sollte das Zusammenspiel von REV3 mit ATR untersucht werden um zu analysieren, bei welchen DNA-Schäden REV3 gemeinsam mit oder getrennt von ATR fungiert. Hierzu wurden die Doppelmutantenlinien *rev3-3 atr-2* und *rev3-5 atr-2* homozygot etabliert und in Sensitivitätstests mit den genotoxischen Agenzien MMC, MMS und Cisplatin behandelt. Das Frischgewicht der Doppelmutanten wurde mit dem des Wildtyps und der jeweiligen Einzelmutanten verglichen. Die Auswertung der mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgänge erfolgte relativ zu den mitgeführten unbehandelten Pflanzen jeder Linie.

Die Ergebnisse der Sensitivitätstests der Doppelmutantenanalysen mit *rev3-3 atr-2* und *rev3-5 atr-2* sind in der Abbildung 3.24 dargestellt. Die Einzelmutantenlinien von *rev3* und *atr-2* sind bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber MMC nicht voneinander zu unterscheiden. Die Doppelmutantenlinien *rev3-3 atr-2* und *rev3-5 atr-2* reagieren vor allem bei 2,5 und 5 µg/ml MMC deutlich stärker auf das Genotoxin, was sich in einem geringeren relativen Frischgewicht auswirkt. Dies ist auch nach Behandlung mit MMS festzustellen. Hier zeigen die Doppelmutanten ebenfalls ein geringeres Frischgewicht als die jeweiligen Einzelmutanten. Zusätzlich kann hier gezeigt werden, dass die Linie *atr-2* sensitiver gegenüber MMS reagiert als die *rev3* Insertionslinien. Die Ergebnisse der Sensitivitätstests mit dem Agens Cisplatin entsprechen denen nach MMC-Behandlung. Die Einzelmutanten weisen ähnlich starke Sensitivitäten gegenüber Cisplatin auf, während die Doppelmutanten ein dazu deutlich verringertes Wachstum zeigen.



**Abbildung 3.24: Reparatur/Toleranz von DNA-Schäden in *rev3 atr-2* Doppelmutanten.** Getestet wurden die Doppelmutanten *rev3-3 atr-2* und *rev3-5 atr-2* im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten und dem Wildtyp auf die genotoxischen Agenzien MMC, MMS und Cisplatin. Nach MMC-Behandlung weisen die beiden *rev3* Insertionslinien sowie die *atr-2* Einzelmutante jeweils ein relatives Frischgewicht von circa 50 % des Wildtyps auf, die beiden Doppelmutanten zeigen bei einer Behandlung von 2,5 und 5 µg/ml MMC ein im Vergleich zu den Einzelmutanten geringeres Frischgewicht (circa 30 %). Nach Behandlung mit MMS weisen die beiden *rev3*-Insertionslinien sowie die *atr-2* Einzelmutante leichte Hypersensitivitäten auf, wobei *atr-2* ein geringfügig geringeres Frischgewicht im Vergleich zum Wildtyp zeigt (circa 70 %) als die *rev3*-Insertionslinien (circa 80 %). Im Vergleich dazu zeigen die beiden Doppelmutanten eine starke Hypersensitivität und damit verbunden ein geringes Frischgewicht (circa 30 % des Wildtyps). Dies ist bei den MMS-Konzentrationen 40 und 60 ppm deutlich zu erkennen. Während die *rev3* und *atr-2* Einzelmutanten eine vergleichbar starke Hypersensitivität gegenüber Cisplatin im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, reagieren die beiden Doppelmutanten bei 5 µM deutlich stärker sensitiv als die Einzelmutanten. Das zum Wildtyp relative Frischgewicht beträgt bei den Einzelmutanten circa 60 % und bei den Doppelmutanten circa 20 %. Die Säulen stellen die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte. Signifikanzniveaus wurden mit Klammern über den jeweiligen Balken gekennzeichnet ( $p < 0,001$ : \*\*\*,  $0,01 > p > 0,001$ : \*\*,  $0,05 > p > 0,01$ : \*).

---

## 4 Diskussion

---

### 4.1 Untersuchungen zur Funktion von HARP und AH2 in *A. thaliana*

Für die Annealing Helikasen HARP und AH2 werden im Menschen Funktionen in einer Reihe zellulärer Prozesse postuliert. Putative Homologe von *HsHARP* und *HsAH2* in *A. thaliana* wurden bisher nicht untersucht. Das Protein At1g48310, auch als CHR18 bekannt, ähnelt in seinem Aufbau stark dem menschlichen HARP, weswegen es als sein Homolog angesehen wird. *AtHARP* besitzt im Gegensatz zu *HsHARP* keine N-terminal liegende RPA-Bindedomäne und statt zwei nur eine Harp-Domäne. Neben *AtHARP* gehört auch ein weiteres Protein in die SMARCAL1-ähnliche Untergruppe der SNF2-Familie in *Arabidopsis*. Dieses ist bislang nur als At5g07810 bekannt und wurde bisher nicht weiter in seiner Struktur untersucht. Durch bioinformatische Analysen wurde die Proteinsequenz von At5g07810 mit *HsAH2* verglichen. Die Proteine besitzen eine Identität von 23,6 % und tragen N-terminal eine typische SNF2-Helikasedomäne. Ferner tragen beide Proteine eine C-terminal gelegene HNH-Domäne. Die in *HsAH2* bekannten Domänen PIPB, APIM und die Zinkfingerdomäne konnten in At5g07810 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.1). Durch Sequenzvergleiche zwischen *HsAH2*, At5g07810 und putativen Homologen in anderen Organismen konnte gezeigt werden, dass die im menschlichen AH2 vorkommende *Harp Like Domain* (HPL) sowohl in At5g07810 als auch den anderen untersuchten Homologen im Pflanzenreich konserviert ist (Abbildung 3.2). Somit wurde At5g07810 als Homolog von *HsAH2* identifiziert. Da *AtAH2* die in *HsAH2* bekannten Motive zur DNA-Interaktion und DNA-Bindung fehlen, könnte dies für verschiedene Funktionsweisen von *AtAH2* und *HsAH2* sprechen. Die Harp-Domänen in *HsHARP* dienen der Bindung von Nukleinsäuren. Sie sind an der DNA-Umstrukturierungsfunktion beteiligt und erlauben die direkte Interaktion von HARP mit der DNA (Mason *et al.*, 2014). Möglicherweise werden diese Funktionen auch durch die HPL-Domäne in den AH2 Homologen vermittelt.

#### 4.1.1 Charakterisierung von *harp*- und *ah2*-T-DNA Insertionsmutanten: Insertionsortbestimmung und Expressionsanalysen

Über NASC wurden je zwei T-DNA-Insertionslinien der Gene *HARP* und *AH2* bezogen. Bei den Linien *harp-2* (GABI\_170B02), *ah2-3* (SALK\_006334) und *ah2-4* (SALK\_137595) konnten die Insertionsorte der T-DNA der sequenzgenau bestimmt werden. Bei der Linie *harp-4* (GABI\_771D06) konnte der Insertionsort nur an der 5'-gelegenen LB sequenzgenau identifiziert werden. Auf der anderen Seite der Insertion konnte weder eine LB

noch eine RB nachgewiesen werden. Hier sollten in weiterführenden Arbeiten beispielsweise Southern Blot-Analysen durchgeführt werden, um größere chromosomale Veränderungen auszuschließen. Durch die Verwendung von jeweils zwei Insertionslinien pro untersuchtem Gen wurde jedoch in dieser Arbeit sichergestellt, dass die Ergebnisse nicht durch mögliche Sekundäreffekte neben der T-DNA-Insertion verfälscht wurden. Die T-DNA-Insertionen der *harp* Mutanten liegen im Intron zwischen Exon elf und zwölf, beziehungsweise in Exon zwölf der insgesamt 24 Exons. Bei den sequenzgenau bestimmten Integrationen der T-DNA kam es zu kürzeren Insertionen und Deletionen am Integrationsort (Abbildung 3.3). Bei den Insertionslinien *ah2-3* und *ah2-4* befinden sich die T-DNAs in Exon zwölf, beziehungsweise an der Intron/Exon-Grenze am 3'-Terminus von Exon neun der insgesamt 25 Exons. Auch hier kam es zu kürzeren Deletionen und Insertionen sowie einer 8 bp umfassenden Duplikation am Integrationsort der Linie *ah2-3* (Abbildung 3.4).

Durch Expressionsanalysen wurde untersucht, welchen Einfluss die inserierte T-DNA auf die Expression der betroffenen Gene hat. Es konnte gezeigt werden, dass in keiner der beiden *harp*-Insertionslinien eine Genexpression über den Bereich der T-DNA-Insertion erfolgt. Dies zu überprüfen war vor allem bei der Linie *harp-2* wichtig, da sich ihre Insertion in einem Intron befindet. Bei Insertionen im Intron besteht die Möglichkeit, dass diese durch Spleißen der prä-mRNA komplett aus der mRNA entfernt werden und es deswegen zur unveränderten Expression des Gens kommt. Im Fall von *harp-2* finden keine oder gestörte Spleißvorgänge des betroffenen Introns statt. Daher wurde die T-DNA nicht aus dem Intron entfernt und aus diesem Grund konnte keine Expression mit einem T-DNA-überspannenden Primerpaar gemessen werden. Bei der Linie *harp-2* erfolgt ferner eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Expression des Gens in 5'- und 3'-Richtung der Insertionsstelle (Abbildung 3.5). Anhand der Ergebnisse der qRT-PCR über die T-DNA kann zwar eine normale Genexpression dieses Bereiches ausgeschlossen werden, jedoch ermöglichen sie keine eindeutige Aussage über die Expression auf Proteinebene. Da die Bereiche in 5'- und 3'-Richtung der der T-DNA-Insertion exprimiert werden, muss davon ausgegangen werden, dass aus diesen Teiltranskripten Teilproteine gebildet werden. In diesem Fall wäre es jedoch wahrscheinlich, dass die inserierte T-DNA zu einem verschobenen Leseraster des Proteins führt, wodurch das Teilprotein in 3'-Richtung der Insertion eine andere Aminosäuresequenz als *HARP* aufweist. Eine Verschiebung des Leserasters führt zudem häufig zu *in-frame* Stopp-Codons und dadurch zu einem Abbruch der Translation. Auch ist es wahrscheinlich, dass bei dem Teiltranskript in 5'-Richtung der Insertion während der Transkription ein Abschnitt der T-DNA angefügt wurde, bis es zu einem Abbruch der Transkription kam. Dies würde bei der Translation zu einem Nonsens-Anhang dieses HARP-Teilproteins führen. Das Teilprotein aus dem Transkript vor der Insertionsstelle würde die Harp-Domäne und den N-terminalen Bereich der SNF2-Helikasedomäne umfassen. Dadurch kann aus dem hierbei exprimierten Teil der SNF2-Helikasedomäne keine vollständige, korrekt gefaltete Domäne gebildet werden. Eine erhöhte Expressionsrate vor der Insertionsstelle liegt auch bei *harp-4* vor. Nach der inserierten T-DNA findet eine im Vergleich zum Wildtyp nur sehr geringe Expression (5,4 %) statt. Möglicherweise kommt es hier zu einem Abbruch der Transkription durch die T-DNA, welche anschließend zu einem geringen Teil wieder aufgenommen wird. Aufgrund der räumlichen Nähe der bei-

den T-DNA-Insertionen würde die Größe des Teilproteins in 5'-Richtung der Insertion bei dieser Insertionslinie dem von *harp-2* ähneln.

Auch bei den *ah2*-Insertionslinien findet über die T-DNA-Insertion eine stark verminderte Expression statt (Abbildung 3.6). Während bei der Linie *ah2-3* eine Restexpression von circa 3,35 % des Wildtyps gemessen wurde, ist diese bei *ah2-4* nahezu nicht vorhanden (0,027 %). Die Expression des Bereiches vor der T-DNA-Insertion entspricht in beiden Insertionslinien dem Wildtyp. Nach der Insertion zeigt die Linie *ah2-3* eine verminderte und *ah2-4* eine etwa 5-fach verstärkte Expression. Bei beiden Linien muss also davon ausgegangen werden, dass die gebildeten Teiltranskripte zu der Bildung von Teilproteinen führen können. Der vordere Bereich des Transkripts in 5'-Richtung der T-DNA würde bei beiden Insertionslinien jedoch lediglich einen Teil der SNF2-Helikasedomäne umfassen, welcher bei *ah2-3* aufgrund der nach 3'-Richtung versetzten T-DNA etwas größer ausfiel als bei *ah2-4*. Eine vollständige, korrekt gefaltete Domäne ist jedoch auch hier nicht zu erwarten. Die stark erhöhte Expression nach der T-DNA-Insertion in der Linie *ah2-4* beruht möglicherweise auf einem Abbruch der Expression und einem verstärkten Neustart innerhalb der T-DNA. Der Vektor zur Transformation der SALK-Linien ist pROK2, der neben einem NOS-Promotor für das Kanamycin-Resistenzgen (*NPTII*) an der RB auch einen 35S-Promotor trägt, der Richtung LB gerichtet ist. Dieser 35S-Promotor hat das Potential, die Expression der flankierenden genomischen Sequenzen zu aktivieren. Ein gebildetes Teilprotein aus dem Transkript würde die HPL- und putative HNH-Domäne umfassen, falls sich das Leseraster nicht verschoben hätte.

Da es sich bei keiner der verwendeten T-DNA-Insertionslinien um Knock-Out-Insertionsmutanten handelt, muss davon ausgegangen werden, dass Teilproteine gebildet werden können. Dies ist vor allem für den vorderen Bereich der Proteine bis zur inserierten T-DNA relevant, da hier noch keine Veränderung des Leserasters stattfinden konnte. Diesen kurzen, korrekt exprimierten Teilproteinen würden jedoch wichtige konservierte Domänen fehlen, weswegen nicht von einer Bildung funktionaler Proteine auszugehen ist.

#### **4.1.2 Sensitivitäten von *harp*- und *ah2*-Insertionsmutanten gegenüber genotoxischem Stress**

Im Menschen führen Mutationen in dem für die Annealing Helikase codierenden Gen *HARP* zu der Multisystemerkrankung Schimke-immunooossäre Dysplasie (SIOD), welche unter anderem mit disproportioniertem Kleinwuchs, faszialen Dysmorphien, T-Zell-Immunodefizienz und Nierenbeschwerden in Zusammenhang gebracht wird. Menschliche *HARP*-defiziente Zelllinien reagieren hypersensitiv auf die genotoxischen Agenzien CPT, MMC und IR. Menschliches *HARP* bindet über sein N-terminal gelegenes RBM direkt an RPA, welches in Eukaryoten für eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur zur Stabilisierung von ssDNA-Intermediaten benötigt wird. Der Verlust von *AH2* führt beim Menschen zu keiner bekannten Krankheit, jedoch reagieren menschliche Zelllinien hypersensitiv auf die DNA-schädigenden Agenzien CPT, HU und Cisplatin. Um zu überprüfen, ob die Homologe in *Arabidopsis* ebenfalls an der Reaktion auf Agenzien beteiligt sind, welche Replikationsstress verursachen, wurden *harp ah2* Doppelmutanten und die jeweiligen Einzelmutanten auf ihre Sensitivität

gegenüber MMC, HU und CPT getestet (Abbildungen 3.7, 3.8 und 3.9). HARP-Defizienz führt in Pflanzen im Gegensatz zum Menschen unter Normalbedingungen zu keinen phänotypischen Auffälligkeiten. Dies gilt auch für Mutanten des Gens *AH2*. Weder die Doppelmutanten noch die *harp* und *ah2* Einzelmutanten reagieren hypersensitiv auf MMC und HU. Ferner wurden die *harp* und *ah2* Einzelmutanten, jedoch nicht die Doppelmutanten, neben den genannten Genotoxinen auch auf ihre Sensitivitäten gegenüber Bleomycin, Cisplatin und MMS getestet und zeigten bei keinem der Genotoxine Auffälligkeiten (nicht gezeigt).

Die durch MMC verursachten Interstrang-Crosslinks an Replikationsgabeln können durch eine Kombination aus *Unhooking* des Crosslinks, TLS-Synthese und HR repariert werden. An der rekombinativen Reparatur durch Invadierung in den bereits synthetisierten Schwesterstrang und der *D-loop*-Bildung könnten Annealing Helikasen beteiligt sein, indem sie das Annealing des invadierenden Stranges an die homologen Sequenzbereiche vermitteln. Im Gegensatz zu der Schadensantwort beim Menschen scheint dieser Reparaturweg in *Arabidopsis* unabhängig von HARP zu verlaufen. Auch *AH2* scheint in *Arabidopsis* nicht an der Reparatur von MMC-verursachten Schäden beteiligt zu sein.

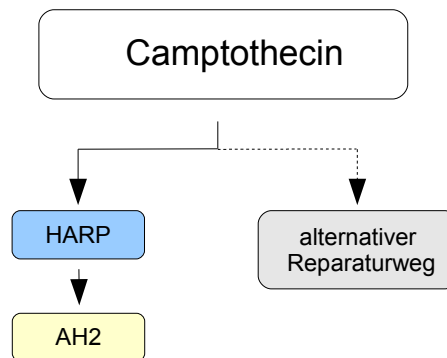
Die Wirkungsweise von HU beruht auf der Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase, was zu einem Stillstand der Replikation führt. In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von HU sowie CPT die HR stark erhöht, welches die Überlebensspanne der behandelten Zellen verlängert. Werden Replikationsgabeln länger als 12 Stunden blockiert, kommt es in Stammzelllinien aus Mäusen vermehrt zu MUS81-induzierten DSBs an diesen Replikationsgabeln, welche über HR repariert werden (Saintigny *et al.*, 2001, Hanada *et al.*, 2006). Bei kürzeren HU-Behandlungen können die angehaltenen Replikationsgabeln durch HR-unabhängige Wege wieder aufgenommen werden (Petermann *et al.*, 2010). Da im Falle der durchgeführten Sensitivitätstests lange HU-Behandlungen vorgenommen werden, muss davon ausgegangen werden, dass in der pflanzlichen DNA DSBs entstanden. Die erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass HARP und *AH2* in *Arabidopsis* nicht an der Reparatur HU-verursachter Schäden beteiligt sind.

Ein anderes Bild ergibt sich nach Behandlung mit CPT. Die *ah2* Einzelmutanten reagieren hypersensitiv auf dieses Genotoxin, während *harp* Einzelmutanten in ihrem Wachstum keinen Unterschied zum Wildtyp zeigen. Interessanterweise ist die Hypersensitivität der *ah2* Einzelmutanten in der *harp ah2* Doppelmutante aufgehoben - diese verhält sich wie *harp* Einzelmutanten beziehungsweise der Wildtyp. CPT ist ein Hemmstoff der Topoisomerase I. Es stabilisiert den kovalenten Komplex zwischen DNA und Topoisomerase I und verhindert die Re-ligation der DNA nach deren Entwindung. Aus dem durch die Topoisomerase verursachten ESB kann durch Auftreffen der Replikationsgabel ein DSB entstehen, welcher einen Stillstand der Replikation mit sich bringt und zum Zelltod führen kann. Somit sind CPT-induzierte Schäden zum größten Teil replikationsabhängig. Auch durch das entstehende Supercoiling der DNA kann es zu DNA-Brüchen kommen (Koster *et al.*, 2007). DNA-DSBs führen zu einer Verlangsamung der Replikation, welche durch Inhibierung des Proteins PARP1 aufgehoben werden kann. Es wurde herausgefunden, dass PARP1 die HR nach CPT-Behandlung fördert und NHEJ unterdrückt (Sugi-



mura *et al.*, 2008). Neuere Studien mit Hefe, menschlichen Zelllinien und *Xenopus laevis* Eiextrakten zeigen, dass PARP1 an einer Regressionen der Replikationsgabeln nach TOP1-Inhibierung beteiligt ist. Dadurch wird die DSB-Bildung limitiert und der Neustart der Gabel durch RECQ1 vermittelt (Chaudhuri *et al.*, 2012, Berti *et al.*, 2013). Sowohl menschliche HARP als auch AH2 defiziente Zelllinien reagieren sensitiv auf CPT. Diese Sensitivität wird durch das Fehlen beider Annealing Helikasen erhöht, weswegen ihnen eine voneinander unabhängige Funktion in der Reaktion auf CPT-induzierte Schäden postuliert wird (Ciccia *et al.*, 2012b). Auch bei anderen Replikationsstress verursachenden Agenzien konnte eine erhöhte Sensitivität in Doppelmutanten im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten festgestellt werden (Yuan *et al.*, 2012). HsAH2 wird durch polyubiquitiniertes PCNA an gestresste Replikationsgabeln rekrutiert. Dies geschieht über die PIP, das APIM und das ZNF-Motiv. Ferner wurde gezeigt, dass HsAH2 Crossover-Ereignisse nach Replikationsstress verhindert, da in AH2-defizienten Zelllinien die Bildung von RAD51-Foci im Vergleich zu WT-Zellen erhöht ist. Dies konnte durch WT AH2 komplementiert werden, jedoch nicht mit Konstrukten mit Punktmutationen in PIP, APIM und ZNF.

In *Arabidopsis* nehmen HARP und AH2 in der Reaktion auf Replikationsstress andere Rollen ein als im Menschen. Dies ist aufgrund ihrer unterschiedlichen Domänenstruktur nicht verwunderlich. Da in AtHARP im Gegensatz zum menschlichen Homolog das zur Interaktion mit RPA wichtige RBM vermutlich nicht vorhanden ist (Ghosal *et al.*, 2011) und in AtAH2 weder PIPB, APIM noch ein ZNF-Motiv gefunden werden konnte, fehlen den Proteinen in *Arabidopsis* wahrscheinlich wichtige Motive zur Protein-Interaktion. Diese vermitteln im Menschen die Rekrutierung der Annealing Helikasen an gestresste Replikationsgabeln. Falls AtHARP und AtAH2 im Bezug auf MMC und HU-induzierte Schäden dennoch eine Funktion einnehmen, ist diese anderen Reaktionswegen untergeordnet. Nur auf CPT reagieren *ah2* Insertionslinien hypersensitiv im Vergleich zum Wildtyp. Hier scheinen HARP und AH2 in einem gemeinsamen Reparaturweg zu fungieren, in welchem HARP AH2 vorangestellt sein muss (Abbildung 4.1). Fehlt funktionales HARP, kann die Zelle auf einen alternativen Reparaturweg ausweichen, weswegen die Hypersensitivität der Doppelmutante aufgehoben ist. Der genaue Mechanismus dieses Zusammenspiels bleibt offen, ebenso wie die Frage, weshalb dieser speziell an CPT-induzierten Schäden angewandt wird und wie die Proteine an die Schäden rekrutiert werden. Es scheint nicht unwahrscheinlich, dass auch in *Arabidopsis* HARP und AH2 an Gabelregressionen nach CPT-Behandlung beteiligt sind. Da in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden konnte, dass HARP an Mechanismen der HR eine Rolle einnimmt, könnte dies auch im Zusammenhang mit CPT-induzierten Schäden der Fall sein. Dann stellt sich jedoch die Frage, weshalb HARP und AH2 keine Funktion in der Reparatur von MMC- und HU-induzierten Schäden haben, welche über HR-Mechanismen repariert werden können. Möglicherweise könnten Doppelmutantenanalysen mit bereits bekannten Faktoren der DNA-Reparatur weitere Erkenntnisse bei diesen Fragestellungen bringen.



**Abbildung 4.1: Funktion von HARP und AH2 an Camptothecin-verursachten Schäden.** HARP und AH2 nehmen in *Arabidopsis* eine bisher unbekannte Funktion ein. Einzelmutanten von AH2, jedoch nicht von HARP, zeigen CPT-Sensitivität. Die Hypersensitivität ist in der Doppelmutante vollständig aufgehoben. Daher scheint HARP in dem Reaktionsweg AH2 vorangestellt zu sein und die Zelle hat die Möglichkeit, bei seinem Fehlen auf einen vergleichbar effizienten Reaktionsweg auszuweichen.

### 4.1.3 *At*HARP in der homologen Rekombination

Neben ihrer Funktion an gestressten Replikationsgabeln wird für Annealing Helikasen auch eine Rolle in Reparaturvorgängen durch HR vermutet. Sowohl SSA als auch SDSA und BIR beruhen auf einem proteinvermittelten Annealing von ssDNA-Abschnitten. Ebenso ist bekannt, dass Helikasen durch Auflösen der Rekombinationsintermediate als Antirekombinasen wirken können. Diese Funktion konnte für die Annealing Helikasen HARP und AH2 im Menschen gezeigt werden. *Hs*AH2 kann die RAD51-vermittelte Ausbildung von *D-loops* hemmen, während für *Hs*HARP eine Rolle in der Auflösung bereits etablierter *D-loops* postuliert wird. Die Funktion in den Reparaturwegen der HR wurde jedoch bisher nicht genauer für Annealing Helikasen untersucht. In dieser Arbeit wurde mithilfe der Insertionslinien *harp-2* und *harp-4* die Funktion von *At*HARP in der HR untersucht. Die dafür verwendeten Reporterkonstrukte dienen dem Nachweis verschiedener Reparaturmechanismen. Das DGU.US-Konstrukt dient dem Nachweis von SSA-Ereignissen, DU.GUS und IU.GUS dem Nachweis von SDSA und das IC9-Konstrukt dem Nachweis von ausschließlich interchromosomaler HR. Sowohl im uninduzierten als auch im Genotoxin-induzierten Zustand konnte in HARP-defizienten Pflanzen ein Rückgang der SSA- und SDSA-Raten verzeichnet werden, welche sich in den beiden Insertionslinien nicht voneinander unterscheiden. Auch die interchromosomale HR ist in den Insertionslinien gehemmt, was in diesem Fall jedoch nur nach der Induktion von DNA-Schäden mit Bleomycin deutlich ist (Abbildungen 3.11 und 3.12). Die Induktion mittels Genotoxinen basiert auf einer unspezifischen Schadensinduktion, welche durch Zufall innerhalb des Konstruktes geschehen muss, um zur Restauration des *GUS*-Reportergens zu führen. Wenn bei dem DGU.US-Konstrukt ein Schaden nicht genau in der Linkersequenz verursacht wird, kann dieses Gen möglicherweise auch durch andere Reparaturmechanismen als SSA restauriert werden. Bei den Reporterkonstrukten DGU.US, DU.GUS und IU.GUS ist neben der unspezifischen Induktion der HR-Rate mit Genotoxinen auch die spezifische Induktion von DSBs innerhalb der Linkersequenz der Konstrukte möglich. Dies geschieht durch die Meganuklease *I-SceI*, deren 18 bp umfassende Erkennungssequenz nicht natürlicherweise im Genom von *Arabidopsis* vorkommt und sich genau einmal innerhalb der

Linkersequenz befindet. Durch Kreuzung von Pflanzen, welche jeweils homozygot bezüglich des Reporterkonstruktes und für die I-SceI-Expressionskassette sind, tragen die aus dieser Kreuzung entstandenen Pflanzen diese Merkmale heterozygot. Die Expression der Meganuklease führt zu einer starken Erhöhung der durch die Konstrukte quantifizierbaren Rekombinationsrate in den betroffenen Pflanzenlinien. Der Vergleich vom Wildtyp und *harp*-Insertionslinien zeigt auch nach I-SceI-Induktion eine verringerte Rekombinationsrate in der Mutante (Abbildung 3.13). Diese Reduktion ist für SSA etwas weniger stark als für SDSA, was auf eine wichtigere Rolle von HARP in der Reparatur über SDSA als über SSA hindeutet. Bei SSA müsste diese Rolle hauptsächlich in einer Annealing Aktivität von HARP gesehen werden, während bei SDSA sowohl die für *HsHARP* beschriebenen Annealing Aktivitäten als auch die Translokaseaktivitäten denkbar wären. HARP spielt demnach eine Rolle in der Förderung der somatischen HR in *Arabidopsis*.

In zukünftigen Arbeiten sollten auch die Rekombinationsraten von *Atah2*-Insertionslinien sowie die der Doppelmutanten beider Gene untersucht werden.

## 4.2 Untersuchungen zur Funktion von REV3 in *A. thaliana*

Die Transläsionspolymerase POL $\zeta$  ist sowohl im Menschen als auch in *Arabidopsis* an der Reparatur verschiedener DNA-Schäden beteiligt. In menschlichen Zelllinien führen Mutationen in dem Gen der katalytischen Untereinheit REV3 zu Hypersensitivität gegenüber MMC und Cisplatin. In Mäusen führt das Fehlen von REV3 zu Embryoletalität. REV3-defiziente Pflanzenlinien zeigen hingegen keine phänotypischen Auffälligkeiten unter Standardbedingungen und Hypersensitivitäten gegenüber MMC, MMS, Cisplatin sowie UV-B und Gammastrahlung. Um das Protein in *Arabidopsis* genauer zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Punktmutationsstudien und Doppelmutantenanalysen durchgeführt.

### 4.2.1 Charakterisierung der T-DNA Insertionsmutante *rev3-5*: Insertionsortbestimmung und Expressionsanalyse

Die Insertionslinie *rev3-2* (SALK\_029237) trägt eine durch die T-DNA Insertion verursachte reziproke Translokation zwischen Chromosom I und V (Curtis *et al.*, 2009). Zwar zeigte diese Insertionslinie bisher keinen von anderen Insertionslinien abweichenden Phänotyp und wurde in zahlreichen Publikationen verwendet, jedoch wurde zur Absicherung der Ergebnisse dieser Arbeit eine weitere Insertionslinie (*rev3-5*, SALK\_126789) über NASC bezogen und durch Insertionsortbestimmung und Expressionsanalyse charakterisiert. Die T-DNA Insertion der Linie *rev3-5* liegt innerhalb des Introns zwischen den Exons acht und neun der insgesamt 22 Exons und damit im Vergleich zu *rev3-2* und der ebenfalls verwendeten Linie *rev3-3* (Sakamoto *et al.*, 2003) weiter vorne im Gen. Bei der Insertion kam es zu kurzen Deletionen der endständigen LBs der T-DNA und der genomischen Sequenz (Abbildung 3.14).

Da es sich bei der T-DNA Insertion um eine Insertion im Intron handelt, wurde mithilfe von Expressionsanalysen sichergestellt, dass diese nicht gemeinsam mit dem Intron aus

der prä-mRNA gespleißt wird (Abbildung 3.15). Da nahezu keine Expression über die Insertionsstelle hinweg gemessen werden konnte, konnte ein Herausspleißen der T-DNA ausgeschlossen werden. Die Expression des Gens in 5'- und 3'-Richtung der T-DNA-Insertion entspricht jeweils der des Wildtyps, weswegen von einer Teilproteinbildung aus den Transkripten ausgegangen werden muss. Da sich die Insertion sehr weit vorne im Gen befindet, würde die Translation des Transkripts in 5'-Richtung der T-DNA jedoch zu einem sehr kurzen Protein führen, dem alle für die TLS notwendigen Domänen fehlen. Da die Expression vor und nach der Insertionsstelle etwa gleich stark ist, besteht die Möglichkeit, dass es nicht zu einem Abbruch und Wiederaufnahme der Transkription kam, sondern dass das komplette Gen inklusive der vollständigen T-DNA transkribiert wurde. In diesem Fall würde die Translation der mRNA mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem dysfunktionalen Protein führen. Zusätzlich kann die inserierte T-DNA eine Verschiebung des Leserasters verursachen, wodurch die Aminosäuresequenz des Proteins im C-terminalen Bereich nicht der des Wildtypproteins entspräche oder es durch das Auftreten der Polymerase auf ein Stopp-Codon zum schnellen Abbruch der Translation käme. Bei Sensitivitätstests aller drei Insertionslinien *rev3-2*, *rev3-3* und *rev3-5* auf MMC konnte kein Unterschied der Sensitivitäten zwischen den Mutanten festgestellt werden.

#### 4.2.2 Komplementationsstudien mit REV3

Mithilfe von Komplementationsstudien sollte die Funktionsweise von REV3 in *Arabidopsis* genauer untersucht werden. Dazu wurden drei Konstrukte kloniert und stabil in die Insertionslinie *rev3-2* und als Kontrolle in den Wildtyp transformiert: ein Wildtyp-Konstrukt und zwei Punktmutationskonstrukte, in denen jeweils eine hoch konservierte Asparaginsäure in Motiv A und Motiv C der Polymerasedomäne des Proteins durch ein Alanin substituiert wurde. So fehlt an dieser Stelle am Protein nur die endständige Carboxylgruppe der Asparaginsäure. Von den Komplementationslinien im Mutantenhintergrund wurden daraufhin vier und von der Kontrolllinie eine homozygote *single locus* Linie etabliert, mit denen Sensitivitätstests durchgeführt wurden.

Der sogenannte Zwei-Metallionen Mechanismus wird, trotz ihrer strukturellen Unterschiede, von allen bekannten DNA-Polymerasen angewandt. Die zwei Metallionen (meist  $Mg^{2+}$ ) werden durch zwei Asparaginsäuren im aktiven Zentrum der Polymerase komplexiert. Das erste Metallion aktiviert das freie 3'-OH-Ende des Primers, wodurch der nukleophile Angriff des Sauerstoffatoms am  $\alpha$ -Phosphat des einzubauenden dNTPs ermöglicht wird. Durch das zweite Metallion wird die Freisetzung des Pyrophosphats des dNTPs unterstützt. Die Motive A, B und C bilden das aktive Zentrum von B-Polymerasen. Dabei gehören Motiv A und C zu der Handflächendomäne des Proteins und Motiv B bildet die Fingerdomäne aus. Die zwischen vielen prokaryotischen, eukaryotischen und viralen Polymerasen invariable Sequenz in Motiv C lautet „YGDTDS“. In Studien mit der  $\phi$ 29 DNA-Polymerase aus einem *Bacillus subtilis* Bakteriophagen wurden alle Aminosäuren dieser Konsensussequenz durch Punktmutationen verändert und die Polymerasen auf ihre Aktivität hin untersucht (Bernad *et al.*, 1990). Im Bezug auf die beiden Asparaginsäuren zeigte sich, dass die Initiierung der Polymeraseaktivität in der Mutante der zweiten Asparaginsäure vollkommen aufgehoben war, und durch die Mutation der ersten

Asparaginsäure stark beeinträchtigt wurde. Bei der Elongation längerer DNA-Abschnitte waren Mutanten beider Aminosäuresubstitutionen stark beeinträchtigt. Bei der Analyse der Reaktion bei kürzeren Polymerisierungsreaktionen zeigte die Mutante der zweiten Asparaginsäure keinerlei Aktivität, während die der ersten Asparaginsäure 30 % Aktivität des Wildtyps aufwies. Somit konnte gezeigt werden, dass nur die zweite Asparaginsäure die Komplexbildung des Metallions vermittelt und absolut für die Polymeraseaktivität benötigt wird, während der ersten Asparaginsäure auch Funktionen in anderen Faktoren wie der Prozessivität und Translokaseaktivität zugewiesen werden konnten. Auch Motiv A (DFQSLYPS) trägt einen katalytischen Asparaginsäurerest für die Metallionenbindung. Ferner ist es für die Interaktion mit dem eintreffenden dNTP und der Koordination von diesem mit den divalenten Metallionen wichtig. Die Konsensussequenz dieses Motivs ist hoch konserviert und Mutationsstudien zeigten, dass Substitutionen innerhalb des Motivs zu veränderter dNTP-Erkennung und Genauigkeit der Polymerase führen. Dies kann unter bestimmten Bedingungen einen Vorteil mit sich bringen (Astatke *et al.*, 1998, Niimi *et al.*, 2004). Die Asparaginsäure ist die einzige Aminosäure des Motivs, deren Mutation zu einem völligen Ausfall der Polymeraseaktivität führt (Patel und Loeb, 2000).

Anhand der chemischen genotoxischen Agenzien MMC, MMS und Cisplatin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Sensitivitäten der *rev3-2* Insertionslinie durch Expression des Wildtypkonstruktes vollständig aufgehoben werden können (Abbildung 3.18). Dies bedeutet, dass das Wildtyp-Konstrukt, welches aus cDNA und gDNA von *REV3* besteht, zu der Expression eines funktionalen REV3 in der Mutantenlinie führt. Ferner kann dadurch ausgeschlossen werden, dass die reziproke Chromosomentranslokation in der Insertionslinie eine Verfälschung der Sensitivitätstests mit sich bringt. Die Kontrolllinie verhält sich bei allen Genotoxinen und deren Konzentrationen wie der Wildtyp. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine vermehrte Expression des Gens weder zu negativen noch zu positiven Wachstumsveränderungen nach Behandlung mit chemischen genotoxischen Agenzien führt.

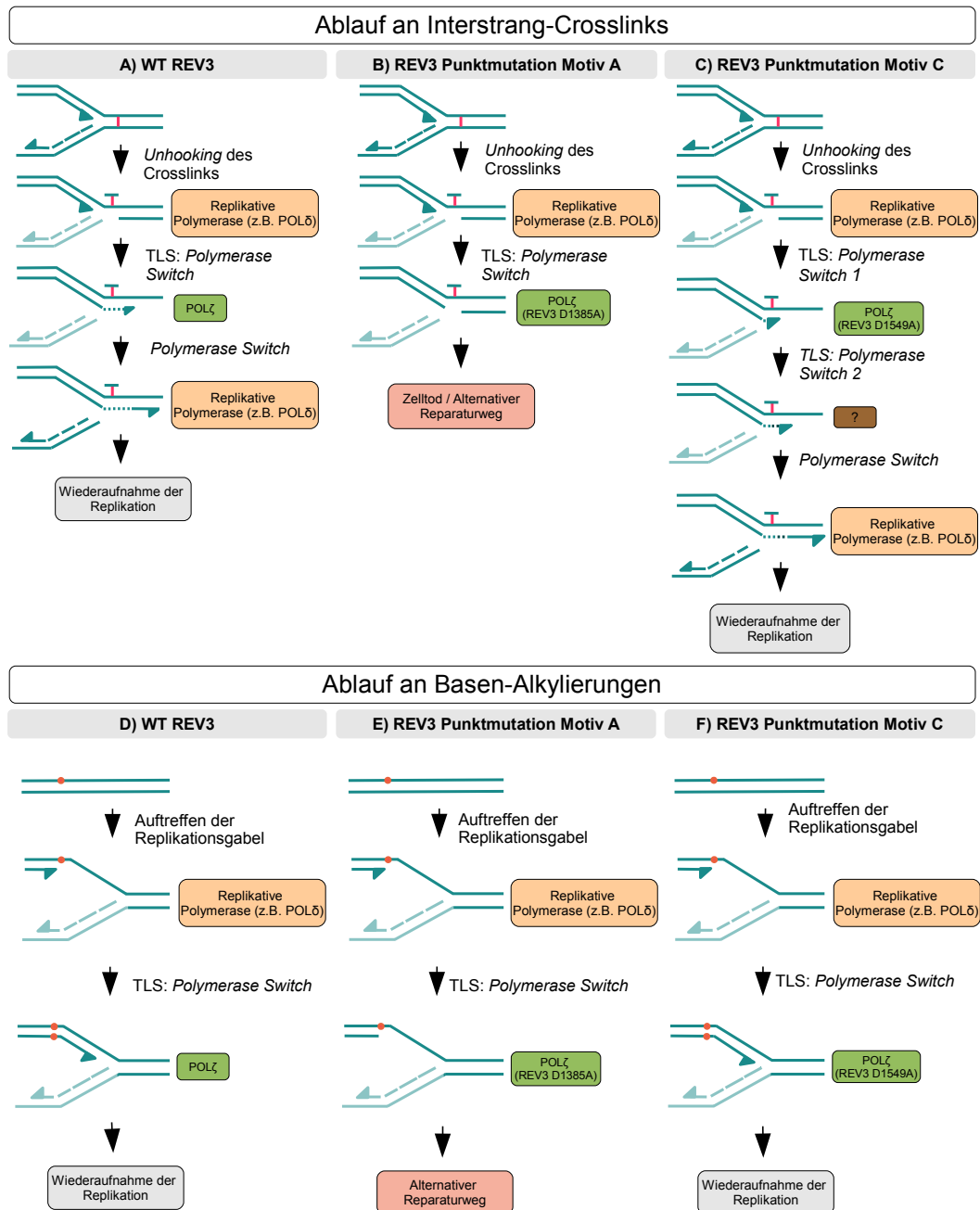
Die Expression des Konstruktes mit einer Punktmutation in Motiv A (D1385A) führt zu einem Protein, in dem die hoch konservierte Asparaginsäure an Position 1385 durch ein Alanin ausgetauscht ist. Nach Behandlung mit den chemischen genotoxischen Agenzien MMC, MMS und Cisplatin zeigen alle vier Komplementationslinien die gleiche Hypersensitivität wie die Insertionslinie. Die Kontrolllinie verhält sich wiederum wie der Wildtyp. Dies bedeutet, dass der Aminosäureaustausch in Motiv A zu einem vollständigen Verlust der Funktionalität von REV3 in Bezug auf die getesteten Schäden führt. Durch die biochemischen Untersuchungen an Polymerasen anderer Organismen ist bekannt, dass ohne die katalytische Asparaginsäure in Motiv A der Cofaktor  $Mg^{2+}$  nicht gebunden werden kann und die Polymerisierungsreaktion nicht stattfinden kann. Daraus lässt sich schließen, dass die Funktion von REV3 in Antwort auf die getesteten Schäden auf seiner Polymeraseaktivität und nicht beispielsweise einer Rekrutierungsfunktion beruht.

Die Sensitivitätstests mit dem Punktmutationskonstrukt bezüglich Motiv C (D149A; entspricht der ersten Asparaginsäure in Motiv C) zeigen ein anderes Bild. Auch hier wurden die Agenzien MMC, MMS und Cisplatin verwendet. Zunächst fällt auf, dass eine

der Komplementationslinien (*rev3::REV3* D1549A#1) bei allen verwendeten getesteten Agenzien und Konzentrationen im Gegensatz zu den anderen drei Komplementationslinien nicht von der *rev3-2* Insertionslinie zu unterscheiden ist. Aufgrund dieser Abweichung wurde per PCR überprüft, ob das Konstrukt vollständig im Genom integriert wurde und es nicht zu endständigen Deletionen des Konstruktes kam. Dies konnte so ausgeschlossen werden (nicht gezeigt). Als Erklärung sind mehrere Szenarien denkbar. Möglicherweise erfolgte die Integration des Konstruktes bei dieser Linie an einen transkriptionell inaktiven Bereich des Genoms wie Telomere oder Centromere oder anderes Heterochromatin. Jedoch werden T-DNAs bevorzugt in transkriptionell aktive Bereiche eingefügt (Schneeberger *et al.*, 2005). Zudem konnte das als Selektionsmarker dienende Gentamycin-Resistenzgen innerhalb des selben Konstruktes exprimiert werden, aus welchem Grund diese Theorie unwahrscheinlich ist. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Insertion der T-DNA in ein ebenfalls für die Reaktion auf die getesteten Schäden beteiligtes Gen erfolgte, wodurch dessen Expression gestört wurde. Ein weiterer denkbarer Grund für die bestehende Hypersensitivität könnte eine Mehrfachinsertion des Konstruktes sein. Eine damit verbundene Überexpression könnte zu einem Gene Silencing Effekt führen. Gerade die Aktivität von TLS-Polymerasen muss stark reguliert werden, um ihre potentiell mutagenen Eigenschaften zu kontrollieren. Da wie bei *rev3::REV3* D1549A#1 beobachtete Effekte vorkommen können, werden für Komplementationsstudien immer mehrere genetisch unterschiedliche Komplementationslinien etabliert und verwendet. Nach MMS-Behandlung der Linien konnte die Hypersensitivität der *rev3-2* Insertionslinie in den drei verbleibenden Komplementationslinien vollständig aufgehoben werden. Die Kontrolllinie zeigt in ihrem relativen Frischgewicht keinen Unterschied zum Wildtyp. Behandlung der Pflanzen mit einer geringen Konzentration von Cisplatin (5  $\mu$ M) führte ebenfalls zu einer Aufhebung der durch die T-DNA in *REV3* verursachte Sensitivität. Interessanterweise zeigen die drei Komplementationslinien nach Behandlung mit einer höheren Konzentration Cisplatin (10  $\mu$ M) einen zwischen dem Wildtyp und der Mutante intermediären Phänotyp. Ein ähnlicher Effekt zeigt sich bei den Sensitivitätstests mit MMC: auch hier zeigen die drei Komplementationslinien ein Frischgewicht, das sich zwischen dem von der Mutante und dem Wildtyp bewegt. Dies ist am deutlichsten bei der geringsten MMC-Konzentration zu sehen, da sich die Sensitivitäten bei höheren MMC-Konzentrationen immer mehr im niedrigen Bereich angleichen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die zwischen verschiedenen Organismen hoch konservierte Asparaginsäure in Motiv C auch in *Arabidopsis* durch eine andere Aminosäure ersetzt werden kann, ohne dass dies zu einem völligen Verlust der Polymeraseaktivität führt. Im Fall von MMS und geringen Konzentrationen von Cisplatin kann die REV3 auch mit dieser Aminosäuresubstitution vollständig auf die verursachten Schäden reagieren. Im Gegensatz dazu scheint die Polymerase ihre Funktion bei hohen Cisplatin-Konzentrationen und MMC nur zu einem Teil ausführen zu können. Dies deutet darauf hin, dass der Reaktion auf MMS und MMC sowie verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen unterschiedliche Funktionsweisen von REV3 zugrunde liegen. Da aus Bakteriophagen bekannt ist, dass Polymerasen mit Mutationen dieser Asparaginsäure eine Restaktivität für kurze Polymerisationsreaktionen aufweisen, könnte es sein, dass diese Restaktivität zur vollständi-

gen Aufhebung der Hypersensitivität bei MMS und niedrigen Cisplatin-Konzentrationen ausreicht. In Bezug auf MMC-Schäden und höhere Cisplatin-Konzentrationen könnte die Polymerase für längere Amplifikationsreaktionen herangezogen werden, für welche Translokaseaktivitäten benötigt werden. Da sie die Translokaseaktivität aufgrund der Mutation nicht ausführen kann, muss REV3 dann eventuell durch eine andere, nicht so effiziente Polymerase ersetzt werden (Abbildung 4.2). Eine weitere denkbare Möglichkeit wäre, dass die Polymerase von der Matrize abgelöst wird und für jedes einzubauende dNTP neu am Strang bindet. Dies würde die Replikation stark verlangsamen und das intermediäre Frischgewicht der Komplementationslinien erklären. Für diese Hypothese spricht, dass bei der DNA-Synthese über Läsionen wie Inter- und Intrastrang-Crosslinks mehrere Basen gegenüber der Läsion eingefügt werden müssen, während bei Alkylierungen nur eine Base von der Läsion betroffen ist. Interessanter Weise wurde in anderen Organismen gezeigt, dass POL $\zeta$  bei der TLS sehr ineffizient darin ist, Nukleotide gegenüber DNA-Läsionen einzufügen. Statt an diesem Insertionsschritt, der dort meist durch eine andere TLS-Polymerase ausgeführt wird, ist POL $\zeta$  vielmehr an der Extension nach dieser Insertion beteiligt (Johnson *et al.*, 2000).

Zur Verifizierung der Ergebnisse mit chemischen genotoxischen Agenzien wurden die Komplementationsstudien mit UV-B-Bestrahlung der Komplementationslinien und der Kontrollen fortgeführt. Zwar macht UV-B-Strahlung nur circa 1,5% der Sonnenenergie aus, stellt jedoch für Organismen eine ernstzunehmende Quelle für Zellschäden dar. Aufgrund seiner hohen Photonenenergie verursacht UV-B-Strahlung DNA- und Proteinschäden, Lipidperoxidation und Pigmentoxidation (Übersicht: Jordan, 1996). Werden die Stammzellen der Wurzel geschädigt, zeigt sich dies in dem verwendeten Modell direkt in verschlechtertem Wurzelwachstum. In *Arabidopsis* konnte für die TLS-Polymerasen POL $\eta$  und POL $\zeta$  gezeigt werden, dass diese für das Überleben der Stammzellen bei UV-B Bestrahlung von großer Bedeutung sind und Mutanten dieser TLS-Polymerasen nach UV-B Bestrahlung verkürztes Wurzelwachstum aufweisen (Curtis und Hays, 2007). Die *pol $\eta$  pol $\zeta$*  Doppelmутante zeigt dabei die höchste Sensitivität, gefolgt von der *pol $\zeta$*  und schließlich der *pol $\eta$*  Einzelmutante. Das Ergebnis der Komplementationsstudien mit UV-B Bestrahlung ähnelt stark den Sensitivitätstests der Linien mit chemischen Genotoxinen (Abbildung 3.21). Ohne Bestrahlung weisen die Linien keinen nennenswerten Unterschied zueinander auf. Das Ergebnis nach 7 kJ m<sup>2</sup> UV-B zeigt am deutlichsten, dass sich auch hier durch Expression des Wildtyp-Konstruktes die Sensitivität der *rev3-2* Mutante komplett aufheben lässt. Die mit dem Punktmutationskonstrukt bezüglich Motiv A transformierten Pflanzen zeigen kein verbessertes Wurzelwachstum im Vergleich zu *rev3-2*, während die Linien bezüglich des Motivs C intermediäre Wurzellängen aufweisen. Dies weist darauf hin, dass auch die Reparatur von UV-induzierten Schäden prozessivere Polymerisierungsaktivität benötigt als die von MMS-Schäden. Dies passt zu der obigen aufgestellten Hypothese zur Reaktion auf Inter- und Intrastrang-Crosslinks sowie Alkylierungen. Da die durch UV-B-Strahlung verursachten CPDs und (6-4)-Photoprodukte ähnlich wie Inter- und Intrastrang-Crosslinks mehrere Basen betreffen, ist auch hier eine Translokaseaktivität der Polymerase erforderlich. Die Kontrolllinien der Punktmutationskonstrukte verhalten sich wie der Wildtyp. Interessanterweise zeigt die Kontrolllinie des



**Abbildung 4.2: Möglicher Ablauf der Reaktion auf DNA-Läsionen mit WT-REV3 und punktmutiertem REV3.** Wird das Wildtyp-Protein REV3 exprimiert, kann es nach *Unhooking* des Crosslinks und einem *Polymerase Switch* über die Läsion hinweg replizieren (A). Punktmutationen in Motiv A führen zum völligen Verlust der Polymeraseaktivität, weswegen REV3 nicht über den Schaden replizieren kann. Dies könnte zum Tod der Zelle führen, wenn diese nicht auf einen alternativen Reparaturweg ausweichen kann (B). Durch die Punktmutation in Motiv C ist die Polymeraseaktivität von REV3 nicht völlig aufgehoben. Vielmehr wird angenommen, dass das Enzym nicht mehr zur Translokation entlang des Matrizenstranges befähigt ist. Nichtsdestotrotz könnte ein kleiner Teil über den Schaden repliziert werden, woraufhin es zu einem erneuten *Polymerase Switch* mit einer ineffizienteren Polymerase kommen könnte. Anschließend könnte die Replikation nach einem weiteren *Polymerase Switch* durch eine replikative Polymerase weitergeführt werden (C). Über alkylierte Basen kann die TLS durch WT-REV3 durchgeführt werden (D). Durch den völligen Verlust der Polymeraseaktivität in der in Motiv A punktmutierten Polymerase kann nicht über alkylierte Basen repliziert werden und die Zelle muss einen alternativen Reparaturweg einschlagen (E). Bei kleineren Läsionen wie Alkylierungen kann die Restaktivität der in Motiv C mutierten Polymerase zur TLS über den Schaden ausreichend sein, wodurch die Replikation normal fortgeführt werden kann (F).



Wildtyp-Konstruktes ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich verbessertes Wurzelwachstum. In der Kontrolllinie könnte es zu einer vermehrten Expression von REV3 kommen, da das eingebrachte Gen zusätzlich zu dem natürlich vorkommenden Gen exprimiert werden kann. Diese mögliche Überexpression könnte den Pflanzen nach UV-B Bestrahlung einen Vorteil bringen, während dies nach Behandlung mit anderen genotoxischen Agenzien nicht zu beobachten war. Allerdings wurde bei den Sensitivitätstests mit chemischen Genotoxinen das Gesamtgewicht der Pflanzen und nicht speziell das Wurzelwachstum untersucht. In dem verwendeten Modell kann es gerade bei sich schnell teilenden Geweben wie der Wurzel von Vorteil sein, den vielen UV-B-induzierten Schäden mit einer hohen Anzahl an REV3 entgegenzuwirken. Hierbei muss beachtet werden, dass durch das eingebrachte Konstrukt ausschließlich REV3, jedoch nicht REV7 sowie weitere putative Komplexpartner von REV3 verstärkt exprimiert werden können. Da gezeigt werden konnte, dass *rev7*-Insertionslinien im Vergleich zu *rev3*-Insertionslinien nur schwach hypersensitiv gegenüber UV-B-Strahlung reagieren (Takahashi *et al.*, 2005), scheint REV3 bei seiner Funktion in der Reaktion auf UV-B induzierte Schäden nicht absolut auf diese akzessorische Untereinheit angewiesen zu sein. Ferner scheint die möglicherweise vermehrte Expression der Punktmutationskonstrukte zusätzlich zum WT-Protein keinerlei Vorteile nach UV-B-Bestrahlung mit sich zu bringen. Um festzustellen, ob und wie stark eine Überexpression von REV3 in der Kontrolllinie vorliegt, sollten in weiteren Arbeiten quantitative Realtime-PCRs bei den betroffenen Linien durchgeführt werden.

#### 4.2.3 REV3 und Faktoren der pflanzlichen DNA-Reparatur

Fungieren zwei Genprodukte in dem selben Reparaturweg für einen bestimmten DNA-Schaden, zeigt ihre Doppelmutante die gleiche Hypersensitivität wie die Einzelmutanten. Sind in einer Doppelmutante zwei wichtige parallele Reparaturwege betroffen, reagiert diese dementsprechend stärker auf das Genotoxin als die Einzelmutanten, da sie nicht in der Lage ist, auf den alternativen Reparaturweg auszuweichen. Diese Überlegungen sind Grundlage der Sensitivitätstests mit den Doppelmutanten von *REV3* mit anderen wichtigen Reparaturfaktoren aus *A. thaliana* und wurden in den folgenden Diskussionen berücksichtigt.

#### REV3, RECQ4A, MUS81 und RAD5A in der DNA-Schadensantwort von *Arabidopsis*

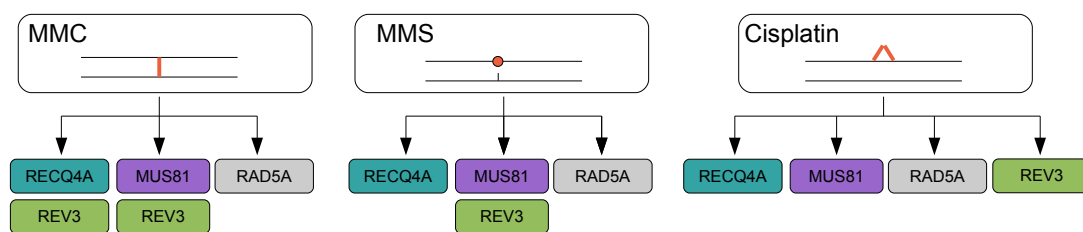
In *Arabidopsis* sind mindestens drei voneinander unabhängige Reaktionswege für bestimmte DNA-Schäden bekannt. Diese werden jeweils durch eines der Proteine RAD5A, RECQ4A und MUS81 repräsentiert (Mannuss *et al.*, 2010). Die durchgeführten Doppelmutantenanalysen sollten der Einordnung von REV3 in diese bekannten Reaktionsmöglichkeiten dienen.

Nach MMC-Behandlung reagieren *rev3*-Einzelmutanten stark hypersensitiv im Vergleich zum Wildtyp, während *recq4a*-Einzelmutanten keine Hypersensitivität zeigen (Abbildung 3.22). Doppelmutanten der beiden Gene weisen in ihrem relativen Frischgewicht keine Unterschiede zu den *rev3*-Einzelmutanten auf. Lange wurde angenommen, dass die RecQ-Helikase RECQ4A keine Funktion in der Reparatur MMC-induzierter Schäden hat.

Jedoch wurde in einer Studie von 2014 herausgefunden, dass *mhf1 recq4a*- sowie *fancm recq4a*-Doppelmutanten hypersensitiv gegenüber MMC reagieren, während die Einzelmutanten keine Sensitivitäten zeigen (Dangel *et al.*, 2014). Daher deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass RECQ4A und REV3 ebenfalls im selben Reparaturweg bezüglich MMC-Schäden arbeiten. Nach der Entkoppelung des Interstrang-Crosslinks und der TLS über die Läsion muss der ebenfalls durch das *Unhooking* entstandene DSB über HR repariert werden. Während REV3 an dem TLS-Schritt dieses Reparaturweges beteiligt zu sein scheint, könnte RECQ4A eine Rolle in der Reparatur über HR spielen. Möglicherweise ist RECQ4A an der Resektion des DSBs beteiligt, der die darauffolgende Stranginvasion ermöglicht. Für BLM, das menschliche strukturelle Homolog von RECQ4A, wurden bereits Resektionsreaktionen nachgewiesen (Gravel *et al.*, 2008). Von Interesse für fortführende Arbeiten wären ebenfalls Sensitivitätstests mit *rev3 mhf1*- sowie *rev3 fancm*-Doppelmutanten. Auf MMS und Cisplatin reagieren *rev3 recq4a*-Doppelmutanten stärker als die jeweiligen Einzelmutanten, welche etwa gleiche Hypersensitivitäten aufweisen. Daraus lässt sich schließen, dass REV3 und RECQ4A in unterschiedlichen Reparaturwegen zur Reaktion auf MMS- und Cisplatin-induzierte DNA-Schäden arbeiten. Das menschliche Homolog von RECQ4A, BLM, ist in der Lage, die Replikationsgabel bei Replikationsstress durch deren Regression zu stabilisieren (Ralf *et al.*, 2006). REV3 kann hingegen über alkylierte Basen und Intrastrang-Crosslinks replizieren, beziehungsweise an der HR zu ihrer Reparatur mitwirken. Daher ist es nicht verwunderlich, dass RECQ4A und REV3 in unterschiedlichen Reparaturwegen zur Reaktion auf diese Schäden fungieren.

Die Einzelmutantenlinien von *rev3* und *mus81-1* zeigen gleich starke Hypersensitivitäten gegenüber MMC. Ihr relatives Frischgewicht beträgt je nach der Genotoxin-Konzentration etwa 20 - 40% des Wildtyps. Doppelmutantenlinien aus *rev3* und *mus81-1* reagieren genauso hypersensitiv gegenüber MMC wie die Einzelmutanten (Abbildung 3.23). Daher kann davon ausgegangen werden, dass REV3 und MUS81 am gleichen Weg zur Reaktion auf MMC-induzierte Interstrang-Crosslinks teilhaben. Diese Beobachtung ist mit dem Modell vereinbar, in dem Interstrang-Crosslinks durch eine Kombination aus einem MUS81-vermittelten *Unhooking* und einer Transläsionssynthese über den entkoppelten Crosslink repariert werden können. Interessanterweise zeigen diese Doppelmutanten auch die gleichen starken Hypersensitivitäten gegenüber MMS wie die *mus81* Einzelmutante. Die *rev3*-Insertionslinien zeigen nur eine geringe Hypersensitivität gegenüber MMS. Dies deutet darauf hin, dass MUS81 und REV3 im selben Reparaturweg zur Reaktion auf MMS-induzierte Alkylierungen arbeiten, wobei MUS81 eine wichtigere Rolle als REV3 einnimmt. Über einen Reparaturmechanismus, der für Alkylierungen sowohl eine Endonuklease als auch eine TLS-Polymerase benötigt, ist bisher nichts bekannt. Alkylierungen können vor dem Eintreffen einer Replikationsgabel durch direkte Umkehrung der Alkylierung mittels Alkyltransferasen entfernt werden, oder durch BER oder NER repariert werden. Trifft eine Replikationsgabel auf eine Alkylierung, kann diese entweder durch Gabelregression, HR oder TLS umgangen werden. Möglicherweise fügt MUS81 an der blockierten Replikationsgabel einen DSB ein, welcher über HR repariert wird und so das Voranschreiten der Replikationsgabel gewährleistet. Die Rolle von REV3 läge

hierbei vermutlich in der Verlängerung des zur HR benötigten *D-loops*. Da in anderen Organismen gezeigt werden konnte, dass POL $\zeta$  an HR-Vorgängen beteiligt ist (Kane *et al.*, 2012), scheint diese Theorie nicht unwahrscheinlich. Um die Rolle von REV3 in der HR in *Arabidopsis* zu untersuchen, sollten mit REV3-defizienten Pflanzenlinien Rekombinationstests durchgeführt werden. Nach Cisplatin-Behandlung liegen die Hypersensitivitäten der Einzelmutanten von *rev3* und *mus81-1* auf dem gleichen Niveau, während die Doppelmutante bei einer geringen Cisplatin-Konzentration einen additiven Effekt zeigt. Demnach fungieren MUS81 und REV3 in unterschiedlichen Mechanismen bei der Reaktion auf Cisplatin-Schäden. Bisher wurde angenommen, dass es in *Arabidopsis* zur Reaktion auf Cisplatin-induzierte Crosslinks drei voneinander unabhängige Wege gibt, welche jeweils durch MUS81, RECQ4A und RAD5A repräsentiert werden. Da bereits bekannt ist, dass RAD5A und REV3 in alternativen Wegen arbeiten (Wang *et al.*, 2011) und in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass MUS81 und RECQ4A ebenfalls unabhängig von REV3 wirken, kann der durch REV3-vermittelte Reaktionsweg als vierte Alternative angesehen werden. Eine grafische Zusammenfassung der beschriebenen Ergebnisse ist in Abbildung 4.3 dargestellt.



**Abbildung 4.3: Einteilung von REV3 in die durch RECQ4A, MUS81 und RAD5A vermittelten Antworten auf DNA-Schäden.** Es ist bereits bekannt, dass RAD5A und REV3 bei der Reaktion auf MMC, MMS und Cisplatin-induzierten Schäden in alternativen Wegen fungieren (Wang *et al.*, 2011). Bei der Antwort auf MMC-induzierte Interstrang-Crosslinks konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MUS81 und REV3 im selben Reaktionsweg fungieren, in dem REV3 jedoch eine untergeordnete Rolle spielt. Auch RECQ4A und REV3 nehmen eine Rolle in demselben Reaktionsweg auf MMC-induzierte Schäden ein. Bei MMS-induzierten Alkylierungen arbeiten MUS81 und REV3 ebenfalls im selben Reaktionsweg, während RECQ4A und RAD5A in alternativen Wegen wirken. Für die Antwort auf Cisplatin-induzierte Intrastrang-Crosslinks repräsentieren die vier Proteine jeweils einen unabhängigen Reaktionsweg.

### Das Zusammenspiel von REV3 und ATR in der DNA-Schadensantwort von *Arabidopsis*

ATR ist eine der sogenannte Master-Checkpointkinasen, welche nach bestimmten DNA-Schäden aktiviert werden und nachgestellte Reparatur- und Zellzyklusfaktoren durch Phosphorylierung aktivieren. Um ein mögliches Zusammenspiel von REV3 mit ATR zu untersuchen, wurden auch hierfür Doppelmutantenanalysen durchgeführt.

Die Sensitivitätstests mit *rev3 atr-2* Doppelmutanten zeigen für alle drei getesteten Genotoxine MMC, MMS und Cisplatin ein ähnliches Ergebnis (Abbildung 3.24). Bei allen Genotoxinen liegen die Hypersensitivitäten der Einzelmutantenlinien auf einem ähnlichen Niveau, während die Doppelmutanten deutlich stärker auf das jeweilige Genotoxin reagieren. So liegt das relative Frischgewicht der Einzelmutanten bei der jeweils geringsten Konzentration MMC bei etwa 50 %, bei MMS etwa 70 - 80% und bei Cisplatin etwa 60 % des

Wildtyps, während das der Doppelmutanten jeweils circa 20 - 30 % des Wildtyps beträgt. Dies bedeutet, dass REV3 und ATR bei der Reaktion auf Inter- und Intrastrang-Crosslinks sowie Alkylierungen in verschiedenen Reparaturwegen wirken. Da die jeweiligen Einzelmutanten von REV3 und ATR eine vergleichbar starke Hypersensitivität gegenüber der getesteten Genotoxine aufweisen, scheinen die Proteinfunktionen von ähnlich großer Bedeutung für die Reaktion auf die Schäden zu sein. ATR wird hauptsächlich durch Replikationsstress und ssDNA-Abschnitte aktiviert, was durch verschiedene Mechanismen wie die Gabelregression zur Stabilisierung der Replikationsgabel beiträgt. REV3 kann durch Monoubiquitinierung von PCNA an gestresste Replikationsgabeln rekrutiert werden. Dies verläuft im Menschen unabhängig von den beiden Checkpointkinasen ATR und ATM (Brun *et al.*, 2010). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die TLS über Intrastrang-Crosslink- und Alkylierungen-verursachende Genotoxine ebenfalls in *Arabidopsis* unabhängig von ATR ablaufen kann. Interstrang-Crosslinks stellen einen Sonderfall der Replikationsblockade dar, da dabei beide DNA-Stränge miteinander verknüpft sind und keine einfache TLS darüber hinweg stattfinden kann. Der aktuell für die Reparatur von Interstrang-Crosslinks anerkannte Mechanismus beruht auf einer Kombination aus TLS und HR des entstehenden einseitigen DSB. Da DSBs nicht primär zur Aktivierung von ATR führen, ist es auch hier nicht überraschend, dass ATR und REV3 in unabhängigen Reaktionswegen arbeiten. Ferner kann ATR-Defizienz zu einer vermehrten Entstehung von DSBs an blockierten Replikationsgabeln führen, welche mit der HR-vermittelten Reparatur der DSBs einhergeht. Es besteht die Möglichkeit, dass REV3 an der HR zur Wiederaufnahme der Replikation nach deren Blockade beteiligt ist, was sich ebenfalls in einem additiven Effekt in den Sensitivitätstests äußern würde. Dies ist nicht unwahrscheinlich, da in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass TLS-Polymerasen in anderen Organismen an der HR mitwirken und *D-loops* verlängern können. Somit fungieren REV3 und ATR bei der Antwort auf alle in dieser Arbeit untersuchten DNA-Schäden in verschiedenen Reaktionswegen. In weiterführenden Arbeiten sollte auch das Zusammenspiel von REV3 mit ATM untersucht werden. Da ATM und ATR in der DNA-Schadensantwort durch unterschiedliche Schäden aktiviert werden können, könnten diese Doppelmutantenanalysen weitere Erkenntnisse über die DNA-Schadensantwort in *Arabidopsis* bringen.

---

## 5 Zusammenfassung

---

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Annealing Helikasen HARP und AH2 sowie die TLS-Polymerase REV3 bezüglich ihrer Funktionen in DNA-Reparatur und -Rekombination in *Arabidopsis thaliana* untersucht.

Durch strukturelle Analysen konnte das vorher nur als At5g07810 bekannte Protein als Homolog des menschlichen AH2 identifiziert werden. Die Homologie zwischen den Proteinen AtCHR18 (*AtHARP*) und HsHARP konnte bestätigt werden. Mithilfe von Sensitivitätstests wurde gezeigt, dass HARP und AH2 in *Arabidopsis* in Bezug auf Schadenstoleranz andere Funktionen einnehmen als ihre menschlichen Homologe. Bezüglich DNA Interstrang-Crosslinks und nach Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase zeigen *Atharp* und *Atah2* keine Hypersensitivitäten. Im Gegensatz dazu konnte für die beiden pflanzlichen Annealing Helikasen eine Funktion in der Reaktion auf den Topoisomerasehemmer Camptothecin nachgewiesen werden. Während nur *Atah2*-Insertionslinien eine Hypersensitivität gegenüber Camptothecin zeigen, ist diese Hypersensitivität in der Doppelmutante aufgehoben. Demnach arbeiten die beiden Proteine in demselben Reaktionsweg, wobei HARP AH2 vorangestellt sein muss und seine Defizienz der Zelle die Möglichkeit zum Ausweichen auf einen alternativen, effizienten Reaktionsweg bieten muss. Weiterhin konnte für HARP eine fördernde Rolle in der pflanzlichen homologen Rekombination nachgewiesen werden.

Mithilfe von Punktmutationen in hoch konservierten Aminosäuren innerhalb des aktiven Zentrums der TLS-Polymerase REV3 konnten verschiedene Mechanismen von REV3 bei der Reaktion auf verschiedene Schäden aufgezeigt werden. In Reaktion auf DNA-Alkylierungen reichen demnach einzelne kurze Polymerisierungsreaktionen des Enzyms aus, während als Antwort auf Interstrang-Crosslinks und UV-B-Schäden höhere Prozessivität des Enzyms gefordert sind. Durch Doppelmutantenanalysen von *rev3* mit Mutanten der strukturspezifischen Endonuklease MUS81, der RecQ-Helikase RECQ4A, sowie der Checkpoint-Kinase ATR konnte REV3 in bestimmte Reaktionswege auf verschiedene DNA-Schäden eingeordnet werden. Den bisher drei in *Arabidopsis* bekannten Reaktionswegen für Intrastrang-Crosslinks konnte dadurch unter anderem ein dazu alternativer Reaktionsweg hinzugefügt werden. Dieser vierte Parallelweg der Schadensantwort wird durch REV3 repräsentiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass REV3 und ATR in der Antwort auf bestimmte DNA-Schäden in getrennten Reaktionswegen fungieren.

---

## 6 Summary

---

The aim of this thesis was to examine the annealing helicases HARP and AH2 as well as the TLS-polymerase REV3 regarding their functions in DNA-repair and -recombination in *Arabidopsis thaliana*.

With structural analysis it was shown that the former AT5G07810 called protein is a distinct homologue of human AH2. The homology between the proteins CHR18 (*AtHARP*) and *HsHARP* was confirmed. With the aid of sensitivity tests it could be shown that HARP and AH2 play different roles in DNA damage tolerance compared to their human homologues. After being exposed to agents that cause interstrand crosslinks and inhibition of the enzyme ribonucleotide reductase, *Atharp* and *Atah2* show no hypersensitivities. While only *Atah2* reacts hypersensitive to the topoisomerase I inhibitor camptothecin, this hypersensitivity is abolished in the double mutant line *harp ah2*. Thus the two proteins act in the same pathway regarding CPT-damage, whereby HARP precedes AH2. Deficiency of HARP enables the cell to fall back on another pathway with similar efficiency. Furthermore it could be shown that HARP promotes homologous recombination in plants.

By introducing point mutations into highly conserved amino acids within the active site of the TLS-polymerase REV3 it was shown that there are different mechanisms of REV3 for reacting on different kinds of damages. While the enzyme sufficiently catalyzes short polymerase reactions on alkylated substrates, there is higher processivity needed for TLS on interstrand crosslinks and UV-B induced lesions. With double mutant analysis of *rev3* and mutants of the structure-specific endonuclease MUS81, the RecQ-helicase RECQ4A as well as the checkpoint kinase ATR it was possible to assign REV3 to certain DNA damage response pathways. It was shown that additionally to the three known pathways for intrastrand crosslink repair, there is a fourth alternate pathway which is resembled by REV3. Furthermore it was shown that REV3 does not interact with ATR in response to certain kinds of DNA damages.

## A Anhang

**Tabelle A.1: Primerkombinationen und -sequenzen für qRT-PCRs zur Expressionsanalyse.** Verwendet wurden pro Insertionslinie drei verschiedene Primerkombinationen. Die Primerkombination A bindet in 5'-Richtung der T-DNA im Gen, die Primerkombination B schließt den Insertionsort ein und die Primerkombination C bindet in 3'-Richtung der T-DNA.

	Primerkomb.	Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing Temp.
<i>harp-2 / harp-4</i>	A	harp1 RT1 FW harp1 RT1 RV	GGTTCATACTTCGTCTCAAGG GATGGTGCAATAATCAGAACC	56 °C
	B	harp1 RT2 FW harp1 RT2 RV	GGTTCTGATTATTGCACCATC CAACTCGTCATGATTGCTTGC	56 °C
	C	harp1 RT3 FW harp1 RT3 RV	GCAAGCAATCATGACGAGTTG CAACACCAGCAGCTCGTATTG	56 °C
<i>ah2-3 / ah2-4</i>	A	AH2 RT1 FW AH2 RT1 RV	GTATTGAGTACTAGTGTGCCG CTGAAGCGTCTTTCCAAGCCC	56 °C
	B ( <i>ah2-3</i> )	AH2-3 RT2 FW AH2-3 RT2 RV	CCTTTCGTGAATGGTTATCTC CAGCAGGCTTGAAAATAGATG	56 °C
	B ( <i>ah2-4</i> )	AH2-4 RT2 FW AH2-4 RT2 RV	CAAGGGTACTCGCTTACTGG CCTGAATTCCATCCAGAACC	56 °C
	C	AH2 RT3 FW AH2 RT3 RV	GAGTGAAATCGCTACGGCC CCGTTGGATCATTAAACCAGGG	56 °C
<i>rev3-5</i>	A	rev3 RT1 FW rev3 RT1 RV	GCTCTACACCTGCTGGTCAG CTCACAAATCATGGATATGTTGCC	56 °C
	B	rev3-5 RT2 FW rev3-5 RT2 RV	GGATGATTGTCCGGGACAAAG CAGAGACTCTGACGTCTGTAATGG	56 °C
	C	rev3 RT3 FW rev3 RT3 RV	CTCTCTAGACCTCGATGTTCTTCAG GGTGAAGAAGCTTCTGAAGG	56 °C
<i>β-TUBULIN</i>		BetaTubulin FW BetaTubulin REV	CCTGATAACTTCGTCTTTGG GTCAACTCCATCTCGTCCAT	56 °C
<i>ACTIN2</i>		Actin2-FW Actin2-REV	CAGATGCCGAGAAGTCTTG GTGCTGTGATTTCTTTGCTC	56 °C

**Tabelle A.2: Verwendete Klonierungsprimer.** Aufgeführt sind die verwendeten Klonierungsprimer zur Amplifikation der In-Fusion-Fragmente sowie die Primer für die durchgeführten Aminosäuresubstitutionen. Die Überhänge an den In-Fusion Primern sind in Kleinbuchstaben dargestellt, ihre Annealing Temperatur bezieht sich auf die Primersequenz ohne den Überhang. Durch die in rot dargestellten Basen wurden die verwendeten Restriktionsschnittstellen des Vektors erhalten. Die für den Aminosäureaustausch veränderten Basen sind in grünen Kleinbuchstaben dargestellt. O, Orientierung; FW, forward; RV, reverse.

Fragment	Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing Temp.	O.
<b>nat. Promotor</b>	In-Fusion7	gagctcggtagccggGTATCTCCGATAGTTCTTACAC	58 °C	FW
	In-Fusion2	cagccatggctgtttCGCCGTGACTTTGACCGGAA		RV
<b>Fragment cDNA (5')</b>	In-Fusion3	aaacagccatggctgATTCTCAATCC	58 °C	FW
	In-Fusion4	aagtcgagctcctggCTCCCATGAA		RV
<b>Fragment gDNA (3') / nat. Terminator</b>	In-Fusion5	ccaggagctcgacttGTTGATATGGTTGTTGATCCA	58 °C	FW
	In-Fusion8	atgcctgcaggtgacCCTACATTGAAGGGATTATCA		RV
AS-substitution	Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing Temp.	O.
<b>D1385A</b>	SK-85	GTTATTGTGTTGgctTTTCAATCTC	54 °C	FW
	SK-86	GAGATTGAAAagcCAACACAATAAC	54 °C	RV
<b>D1549A</b>	SK-87	GAGTTGTATATGGTgccACTGATAGG	54 °C	FW
	SK-88	CCTATCAGTggcACCATATACAACCTC	54 °C	RV

**Tabelle A.4: Verwendete Primer für PCR-basierte Genotypisierungen: Reporterlinien.** Aufgeführt sind die für PCR-basierte Genotypisierungen verwendeten Primerkombinationen mit den verwendeten Annealing Temperaturen. Diese gelten jeweils für die verwendete Primerkombination zur Identifikation des WT-Allels oder der T-DNA-Insertion. Es wurde standardmäßig eine Amplifikationsdauer von 1:10 min gewählt.

Linie	Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing Temp.	
<b>IC9</b>	WT	IC9C-fw-lang IC9C-RW	GAAGAACCTACCTGGTCTGT CCAGAAGTAAAAGTGAAGTTC	56 °C
	T-DNA	IC9C-fw-lang GABI-LB	GAAGAACCTACCTGGTCTGT TTGGACGTGAATGTAGACAC	
<b>DGU.US</b>	WT	SSA gFW SSA gRV	TCTCCAATTTGCATACCTCATACC TCAGCTTTGTCATTGTGGGATAA	56 °C
	T-DNA	UFW TGIUS RB5 SSA gRV	GTT GCG CAG CCT GAA TGG C TCAGCTTTGTCATTGTGGGATAA	
<b>DU.GUS</b>	WT	DU8 gFW2 DU8 gRV2	ATCGCCGGAAGAAGGAAGACCATC ACACAAGCGAGCCATCCACTACCA	56 °C
	T-DNA	DU8 gFW2 GUS RV3 (RB)	ATCGCCGGAAGAAGGAAGACCATC ATAAAGACTTCGCGTGATACC	
<b>IU.GUS</b>	WT	IU8 gFW IU8 gRV	ACTTATTTGCGTGTCTGTTACTT GAAATCGATTACTAGCCACCACTC	56 °C
	T-DNA	GABI-LB IU8 gRV	TTGGACGTGAATGTAGACAC GAAATCGATTACTAGCCACCACTC	
<b>I-SceI#8</b>	WT	2S-I-SceI#8 gFW 2S-I-SceI#8 gRV	GGCGATCTCGACTCTCCTCTG TCATCTCTTCCCGTAAAACCTCAA	56 °C
	T-DNA	pTV3 2S-I-SceI#8 gRV	GTTATCCGCTCACAATTCCAC TCATCTCTTCCCGTAAAACCTCAA	



**Tabelle A.3: Verwendete Primer für PCR-basierte Genotypisierungen.** Aufgeführt sind die für PCR-basierte Genotypisierungen verwendeten Primerkombinationen mit den verwendeten Annealing Temperaturen. Diese gelten jeweils für die verwendete Primerkombination zur Identifikation des WT-Allels oder der T-DNA-Insertion. Die Fragmentgrößen betragen circa 400 - 1200 bp, es wurde standardmäßig eine Amplifikationsdauer von 1:10 min gewählt.

Linie		Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing Temp.
<b>ah2-3</b>	WT	harp1(V)-3 FW NEU harp1(V)-3 REV NEU	GCTCGTGGATCAAATGAAG CTATGTGCTCTATCCTCAG	54 °C
	T-DNA	harp1(V)-3 FW NEU Lbb1.3	GCTCGTGGATCAAATGAAG ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	54 °C
<b>ah2-4</b>	WT	harp1(V)-4 FW NEU harp1(V)-4 REV NEU	CAGATAGGACTAGTCTCTC GATAGAAGTGGATGTAGAG	54 °C
	T-DNA	harp1(V)-4 FW NEU Lbb1.3	CAGATAGGACTAGTCTCTC ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	54 °C
<b>harp-2</b>	WT	harp1 FW NEU harp1 REV NEU	CTACTTGACATTGTTTATG CATCCAGAGATACACAAGG	54 °C
	T-DNA	GABI-LB harp1 REV NEU	TTGGACGTGAATGTAGACAC CATCCAGAGATACACAAGG	54 °C
<b>harp-4</b>	WT	harp1 FW NEU harp1 REV NEU	CTACTTGACATTGTTTATG CATCCAGAGATACACAAGG	54 °C
	T-DNA	harp1 FW NEU GABI-LB	CTACTTGACATTGTTTATG TTGGACGTGAATGTAGACAC	54 °C
<b>rev3-2</b>	WT	rev3 FW2 rev3 RV2	CTTCAGCTACAAAACATCGTCAT CTCTGGCTGTGCTCTTTATTATT	56 °C
	T-DNA	rev3 FW2 Lbd1	CTTCAGCTACAAAACATCGTCAT TCGGAACCACCATCAAACAG	56 °C
<b>rev3-3</b>	WT	SK-63 SK-64	CGACCTGATCCACGATTTGATTCTGTC CTACTTGAGCAGGATTAGCTACCAACGG	56 °C
	T-DNA	SK-63 Lbd1	CGACCTGATCCACGATTTGATTCTGTC TCGGAACCACCATCAAACAG	56 °C
<b>rev3-5</b>	WT	SK-75 SK-76	GCCCTGAAGCCTTCCTTACTTG GAAGAGGCTAGTTCAAACGTCC	56 °C
	T-DNA	SK-75 Lbd1	GCCCTGAAGCCTTCCTTACTTG TCGGAACCACCATCAAACAG	56 °C
<b>atr-2</b>	WT	ATR2 fw ATR2 rev	TGGATCAGGTGCCTTCAATATC CTAAGAGTGCAGGTAATGCAGCA	56 °C
	T-DNA	Lbd1.3 ATR2 rev	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC CTAAGAGTGCAGGTAATGCAGCA	56 °C
<b>recq4a-4</b>	WT	rq4A gFW rq4A gRV	TGGTCTTTCATCTGCTCCTGTA AGCTGCCAAAGAAAGATGTTAGAA	56 °C
	T-DNA	GABI-LB rq4A gRV	TTGGACGTGAATGTAGACAC AGCTGCCAAAGAAAGATGTTAGAA	56 °C
<b>mus81-1</b>	WT	Mus81-1 Mus81 R2	AGTGAATCTGATAGTGAGTG GCAGCATCAATAAGCTCTTGT	56 °C
	T-DNA	Mus81-1 GABI-LB	AGTGAATCTGATAGTGAGTG TTGGACGTGAATGTAGACAC	56 °C

**Tabelle A.5: Daten der qRT-PCRs zur Expressionsanalyse.** Aufgeführt sind die auf das Haushaltsgen *ACTIN2* normalisierten Expressionsdaten der charakterisierten Insertionslinien relativ zum Wildtyp.

<b>Primerkombination A</b>	<b>WT</b>	<b><i>harp-2</i></b>	<b><i>harp-4</i></b>	<b><i>ah2-3</i></b>	<b><i>ah2-4</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b>
Durchgang 1	1,0000	1,5690	2,7920	0,8809	1,4390	1,1000
Durchgang 2	1,0000	2,6270	1,8670	0,6801	0,8680	0,8214
Durchgang 3	1,0000	1,0850	1,1230	0,4728	0,7961	1,1200
Mittelwert	1,0000	1,7603	1,9273	0,6779	1,0344	1,0138
Stabw	0,0000	0,7886	0,8361	0,2041	0,3523	0,1669
<b>Primerkombination B</b>	<b>WT</b>	<b><i>harp-2</i></b>	<b><i>harp-4</i></b>	<b><i>ah2-3</i></b>	<b><i>ah2-4</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b>
Durchgang 1	1,0000	0,0001	0,0002	0,0000	0,0004	0,0002
Durchgang 2	1,0000	0,0005	0,0001	0,1005	0,0000	0,0001
Durchgang 3	1,0000	0,0003	0,0003	0,0000	0,0004	0,0050
Mittelwert	1,0000	0,0003	0,0002	0,0335	0,0003	0,0018
Stabw	0,0000	0,0002	0,0001	0,0580	0,0002	0,0028
<b>Primerkombination C</b>	<b>WT</b>	<b><i>harp-2</i></b>	<b><i>harp-4</i></b>	<b><i>ah2-3</i></b>	<b><i>ah2-4</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b>
Durchgang 1	1,0000	2,9000	0,0585	0,1307	5,4100	2,3410
Durchgang 2	1,0000	3,3470	0,0815	0,3930	5,3910	0,8126
Durchgang 3	1,0000	1,2650	0,0212	0,0766	2,8940	0,6707
Mittelwert	1,0000	2,5040	0,0537	0,2001	4,5650	1,2748
Stabw	0,0000	1,0960	0,0304	0,1692	1,4472	0,9261

**Tabelle A.6: Relative Frischgewichte der *harp* und *ah2* Einzel- und Doppelmutanten nach CPT Behandlung.** Aufgeführt sind die relativen Frischgewichte nach Behandlung mit 50, 100 und 200 nM CPT.

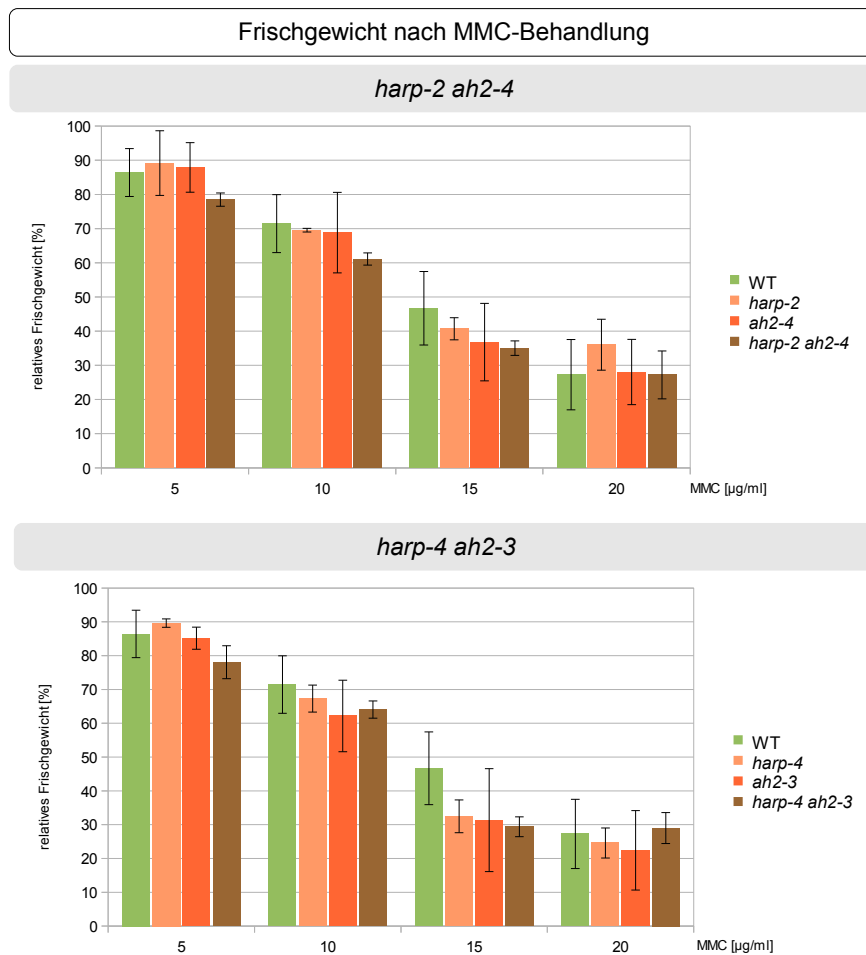
50 nM CPT	WT	<i>harp-2</i>	<i>harp-4</i>	<i>ah2-3</i>	<i>ah2-4</i>	<i>harp-2</i> <i>ah2-3</i>	<i>harp-2</i> <i>ah2-4</i>	<i>harp-4</i> <i>ah2-3</i>	<i>harp-4</i> <i>ah2-4</i>
Durchgang 1	55,83	57,91	50,70	39,22	35,08	51,83	57,14	50,47	48,93
Durchgang 2	53,94	57,98	48,74	29,80	33,72	53,90	59,03	55,27	56,93
Durchgang 3	36,09	39,77	43,40	28,83	29,18	48,81	37,34	38,46	44,84
Durchgang 4	45,96	47,46	49,18	34,13	29,74	49,47	43,55	53,60	40,86
Mittelwert	47,95	50,78	48,01	32,99	31,93	51,00	49,27	49,45	47,89
Stabw	9,00	8,85	3,18	4,75	2,91	2,32	10,52	7,59	6,87
t-Test gegen WT		0,670	0,992	0,036	0,032	0,553	0,856	0,808	0,991
t-Test gegen <i>ah2-3</i>		0,019	0,003			0,002		0,014	
t-Test gegen <i>ah2-4</i>		0,019	0,000				0,041		0,013

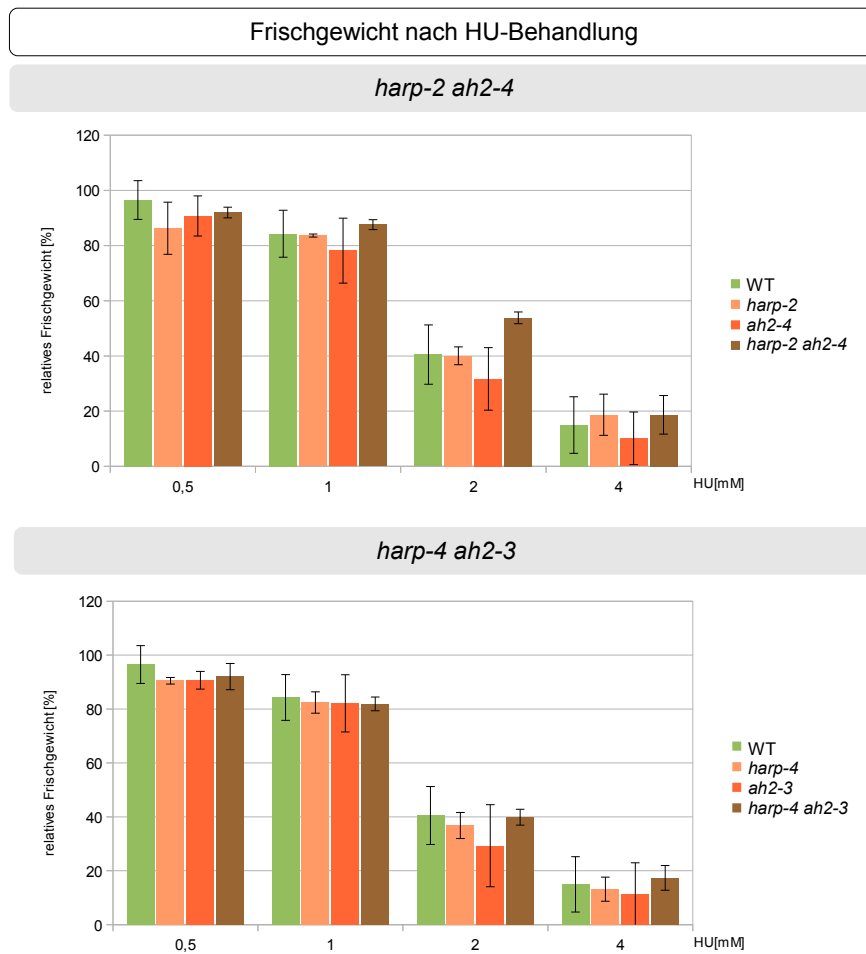
100 nM CPT	WT	<i>harp-2</i>	<i>harp-4</i>	<i>ah2-3</i>	<i>ah2-4</i>	<i>harp-2</i> <i>ah2-3</i>	<i>harp-2</i> <i>ah2-4</i>	<i>harp-4</i> <i>ah2-3</i>	<i>harp-4</i> <i>ah2-4</i>
Durchgang 1	31,56	36,40	29,99	22,46	25,71	42,79	40,31	24,72	30,84
Durchgang 2	33,21	32,22	39,38	22,53	20,19	31,02	31,94	38,96	32,09
Durchgang 3	23,23	24,68	30,96	18,71	21,13	31,30	21,74	29,13	24,88
Durchgang 4	24,34	29,59	24,66	21,70	14,38	27,00	23,52	31,47	26,79
Mittelwert	28,08	30,72	31,25	21,35	20,35	33,03	29,38	31,07	28,65
Stabw	5,03	4,91	6,09	1,80	4,66	6,80	8,54	5,96	3,38
t-Test gegen WT		0,48	0,45	0,07	0,07	0,29	0,80	0,47	0,86

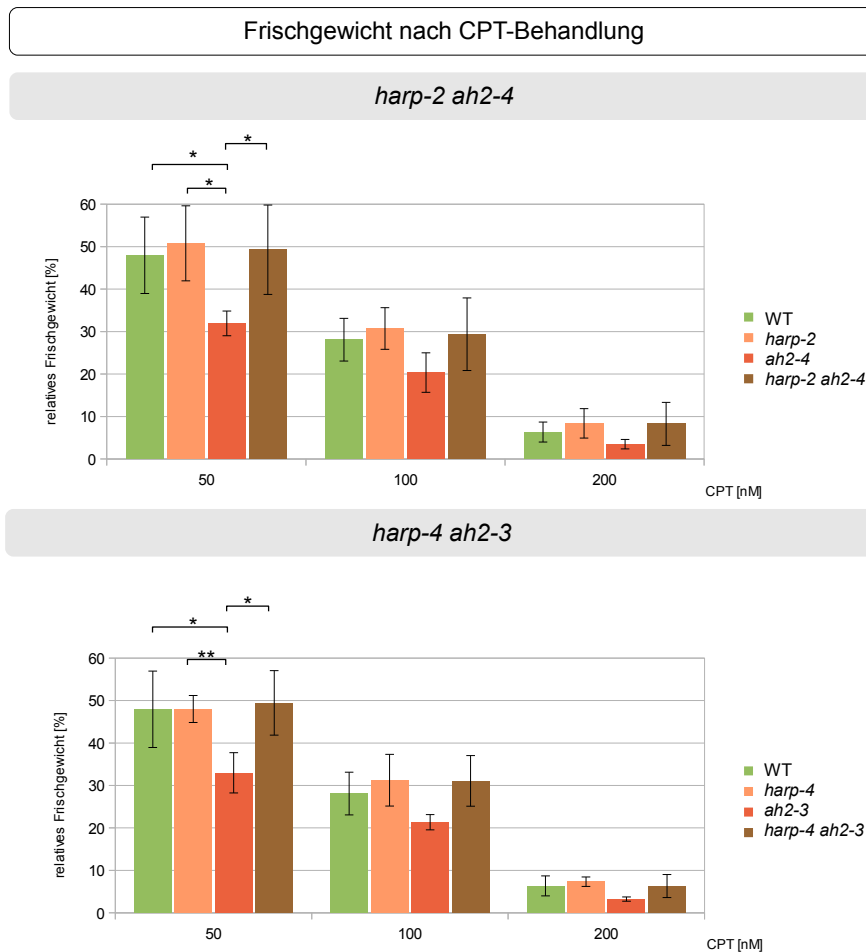
200 nM CPT	WT	<i>harp-2</i>	<i>harp-4</i>	<i>ah2-3</i>	<i>ah2-4</i>	<i>harp-2</i> <i>ah2-3</i>	<i>harp-2</i> <i>ah2-4</i>	<i>harp-4</i> <i>ah2-3</i>	<i>harp-4</i> <i>ah2-4</i>
Durchgang 1	7,58	11,21	6,07	3,76	4,74	12,15	13,56	4,26	7,27
Durchgang 2	7,83	9,45	8,17	3,20	3,04	7,21	7,81	9,39	6,28
Durchgang 3	3,64	4,52	7,75	2,75	2,64	7,07	3,46	5,27	4,86
Mittelwert	6,35	8,39	7,33	3,24	3,47	8,81	8,27	6,30	6,14
Stabw	2,35	3,47	1,11	0,51	1,12	2,90	5,07	2,72	1,21
t-Test gegen WT		0,45	0,56	0,11	0,16	0,32	0,60	0,98	0,90



**Abbildung A.1: Reparatur von DNA-Schäden nach MMC-Behandlung in *harp ah2* Einzel- und Doppelmutanten.** Die Insertionslinien *harp-2*, *harp-4*, *ah2-3*, *ah2-4* sowie deren Doppelmutanten *harp-2 ah2-4* und *harp-4 ah2-3* wurden mit 5, 10, 15 und 20  $\mu\text{g/ml}$  MMC behandelt. Dargestellt ist das zu den unbehandelten Pflanzen relative Frischgewicht nach Behandlung der einzelnen Linien im Vergleich zum Wildtyp. Die Einzel- und Doppelmutanten zeigten eine mit dem Wildtyp vergleichbare Sensitivität. Die Säulen geben die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen an, die Fehlerbalken stellen die Stabwe der Mittelwerte dar.



**Abbildung A.2: Reparatur von DNA-Schäden nach HU-Behandlung in *harp ah2* Einzel- und Doppelmutanten.** Die Insertionslinien *harp-2*, *harp-4*, *ah2-3*, *ah2-4* sowie deren Doppelmutanten *harp-2 ah2-4* und *harp-4 ah2-3* wurden mit 0,5, 1, 2 und 4 mM HU behandelt. Dargestellt ist das zu den unbehandelten Pflanzen relative Frischgewicht nach Behandlung der einzelnen Linien im Vergleich zum Wildtyp. Die Einzel- und Doppelmutanten zeigten eine mit dem Wildtyp vergleichbare Sensitivität. Die Säulen geben die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen an, die Fehlerbalken stellen die Stabw der Mittelwerte dar.



**Abbildung A.3: Reparatur von DNA-Schäden nach CPT-Behandlung in *harp ah2* Einzel- und Doppelmutanten.** Die Insertionslinien *harp-2*, *harp-4*, *ah2-3*, *ah2-4* sowie deren Doppelmutanten *harp-2 ah2-4* und *harp-4 ah2-3* wurden mit 50, 100 und 200  $\mu\text{M}$  CPT behandelt. Dargestellt ist das zu den unbehandelten Pflanzen relative Frischgewicht nach Behandlung der einzelnen Linien im Vergleich zum Wildtyp. Die beiden *harp*-Insertionslinien wiesen keine Sensitivität gegenüber CPT-Behandlung auf, während die beiden *ah2* Einzelmutanten ein deutlich geringeres relatives Frischgewicht zeigten. Dies ist bei 50  $\mu\text{M}$  CPT am deutlichsten erkennbar. Hier lag das Frischgewicht der *ah2* Einzelmutanten bei circa 60% des Wildtyps. Bei den jeweiligen Doppelmutanten war die Sensitivität der *ah2* Einzelmutante aufgehoben. Die Säulen geben die Mittelwerte aus mindestens drei biologisch unabhängigen Durchgängen an, die Fehlerbalken stellen die Stabw der Mittelwerte dar.

**Tabelle A.7: Genotoxininduzierte Rekombinationstests der *harp*-Insertionslinien: DGU.US, DU.GUS und IU.GUS.** Aufgeführt sind jeweils die absoluten und relativen Anzahlen der Blauen Sektoren von Rekombinationstests mit *harp-2* und *harp-4*. Verglichen wurden jeweils die Insertionslinie mit dem Wildtyp im uninduzierten und genotoxininduzierten Zustand im DGU.US, DU.GUS und IU.GUS-Reporterhintergrund. Bleo = Bleomycin.

absolut DGU.US	uninduziert		+ Bleo		uninduziert		+ Bleo	
	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	10,867	8,407	52,793	27,200	16,400	7,367	92,828	29,033
Durchgang 2	17,067	8,867	94,968	28,000	14,400	9,800	77,167	34,100
Durchgang 3	22,900	9,500	104,100	35,710	17,967	11,433	81,167	35,300
Mittelwert	16,944	8,925	83,954	30,303	16,256	9,533	83,720	32,811
Stabw	6,018	0,549	27,369	4,699	1,788	2,046	8,137	3,326

relativ DGU.US	uninduziert		+ Bleo		uninduziert		+ Bleo	
	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	100,000	77,369	100,000	51,522	100,000	44,919	100,000	31,277
Durchgang 2	100,000	51,953	100,000	29,484	100,000	68,056	100,000	44,190
Durchgang 3	100,000	41,485	100,000	34,303	100,000	63,636	100,000	43,491
Mittelwert	100,000	56,936	100,000	38,436	100,000	58,870	100,000	39,652
Stabw	0,000	18,454	0,000	11,586	0,000	12,283	0,000	7,262
t-Test gegen WT		0,016		0,001		0,004		0,000

absolut DU.GUS	uninduziert		+ MMC		uninduziert		+ MMC	
	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	9,107	4,133	49,379	21,767	6,267	2,700	42,567	9,419
Durchgang 2	6,677	6,161	55,828	18,774	4,933	3,000	44,433	7,867
Durchgang 3	6,065	4,400	59,433	16,000	7,367	5,367	38,667	4,500
Mittelwert	7,283	4,898	54,880	18,847	6,189	3,689	41,889	7,262
Stabw	1,609	1,102	5,094	2,884	1,219	1,461	2,942	2,515

relativ DU.GUS	uninduziert		+ MMC		uninduziert		+ MMC	
	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	100,000	45,386	100,000	44,081	100,000	43,085	100,000	22,128
Durchgang 2	100,000	92,271	100,000	33,629	100,000	60,811	100,000	17,704
Durchgang 3	100,000	72,553	100,000	26,921	100,000	72,851	100,000	11,638
Mittelwert	100,000	70,070	100,000	34,877	100,000	58,916	100,000	17,157
Stabw	0,000	23,541	0,000	8,648	0,000	14,973	0,000	5,267
t-Test gegen WT		0,092		0,000		0,009		0,000

absolut IU.GUS	uninduziert		+ MMC		uninduziert		+ MMC	
	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	7,867	5,400	59,500	17,667	7,633	2,100	34,167	5,767
Durchgang 2	9,233	5,276	48,133	13,633	6,300	4,000	29,267	12,500
Durchgang 3	7,414	5,581	28,581	16,167	7,767	2,600	42,000	11,167
Mittelwert	8,171	5,419	45,405	15,822	7,233	2,900	35,144	9,811
Stabw	0,947	0,153	15,639	2,039	0,811	0,985	6,423	3,565

relativ IU.GUS	uninduziert		+ MMC		uninduziert		+ MMC	
	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	100,000	68,644	100,000	29,692	100,000	27,511	100,000	16,878
Durchgang 2	100,000	57,139	100,000	28,324	100,000	63,492	100,000	42,711
Durchgang 3	100,000	75,274	100,000	56,565	100,000	33,476	100,000	26,587
Mittelwert	100,000	67,019	100,000	38,194	100,000	41,493	100,000	28,725
Stabw	0,000	9,176	0,000	15,925	0,000	19,284	0,000	13,048
t-Test gegen WT		0,003		0,003		0,006		0,001

**Tabelle A.8: Genotoxininduzierte Rekombinationstests der *harp*-Insertionslinien: IC9.** Aufgeführt sind jeweils die absoluten und relativen Anzahlen der Blauen Sektoren von Rekombinationstests mit *harp-2* und *harp-4*. Verglichen wurden jeweils die Insertionslinie mit dem Wildtyp im uninduzierten und genotoxininduzierten Zustand im IC9-Reporterhintergrund. Bleo = Bleomycin.

absolut IC9	uninduziert		+ Bleo		uninduziert		+ Bleo	
	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	0,267	0,167	2,355	2,138	0,167	0,133	3,667	1,200
Durchgang 2	0,100	0,133	3,567	2,483	0,100	0,267	4,233	1,000
Durchgang 3	0,065	0,129	0,645	0,613	0,167	0,233	3,600	2,133
Mittelwert	0,144	0,143	2,189	1,745	0,144	0,211	3,833	1,444
Stabw	0,108	0,021	1,468	0,995	0,038	0,069	0,348	0,605
relativ IC9	uninduziert		+ Bleo		uninduziert		+ Bleo	
	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	100,000	62,500	100,000	90,789	100,000	80,000	100,000	32,727
Durchgang 2	100,000	133,333	100,000	69,610	100,000	266,667	100,000	23,622
Durchgang 3	100,000	200,000	100,000	95,000	100,000	140,000	100,000	59,259
Mittelwert	100,000	131,944	100,000	85,133	100,000	162,222	100,000	38,536
Stabw	0,000	68,761	0,000	13,607	0,000	95,297	0,000	18,515
t-Test gegen WT		0,466		0,131		0,321		0,005



**Tabelle A.9: I-SceI-induzierte Rekombinationstests der *harp*-Insertionslinien.** Aufgeführt sind jeweils die absoluten und relativen Anzahlen der Blauen Sektoren von Rekombinationstests mit *harp-2* und *harp-4*. Verglichen wurden jeweils die Insertionslinie mit dem Wildtyp im I-SceI-induzierten Zustand im DGU.US, DU.GUS und IU.GUS-Reporterhintergrund.

DGU.US absolut	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	289,600	185,967	684,998	443,891
Durchgang 2	208,793	176,185	695,498	452,470
Durchgang 3	228,133	161,200	707,868	461,229
Mittelwert	242,175	174,451	696,121	452,530
Stabw	42,194	12,474	11,447	8,669

DGU.US relativ	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	100,000	64,215	100,000	64,802
Durchgang 2	100,000	84,383	100,000	65,057
Durchgang 3	100,000	70,660	100,000	65,158
Mittelwert	100,000	73,086	100,000	65,005
Stabw	0,000	10,300	0,000	0,183
t-Test gegen WT		0,046		0,000

DU.GUS absolut	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	105,750	56,533	108,967	53,833
Durchgang 2	100,433	38,241	98,321	51,379
Durchgang 3	105,400	22,267	109,200	39,700
Mittelwert	103,861	39,014	105,496	48,304
Stabw	2,974	17,146	6,214	7,552

DU.GUS relativ	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	100,000	53,459	100,000	49,403
Durchgang 2	100,000	38,076	100,000	52,256
Durchgang 3	100,000	21,126	100,000	36,355
Mittelwert	100,000	37,554	100,000	46,005
Stabw	0,000	16,173	0,000	8,478
t-Test gegen WT		0,022		0,008

IU.GUS absolut	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	61,192	24,133	45,793	19,600
Durchgang 2	65,533	20,172	84,033	31,207
Durchgang 3	58,233	27,593	66,600	25,867
Mittelwert	61,653	23,966	65,475	25,558
Stabw	3,672	3,713	19,145	5,810

IU.GUS relativ	WT	<i>harp-2</i>	WT	<i>harp-4</i>
Durchgang 1	100,000	39,439	100,000	42,801
Durchgang 2	100,000	30,782	100,000	37,136
Durchgang 3	100,000	47,383	100,000	38,839
Mittelwert	100,000	39,201	100,000	39,592
Stabw	0,000	8,303	0,000	2,907
t-Test gegen WT		0,006		0,001

**Tabelle A.10: Daten der Komplementationstudien mit MMC-Behandlung: Wildtyp-Konstrukt.** Aufgeführt ist das zur unbehandelten Probe der jeweiligen Linie relative Frischgewicht.

5 µg/ml MMC	WT	rev3-2	rev3-2::REV3#1	-#2	-#3	-#4	WT::REV3#1
Durchgang 1	95,77	40,38	92,57	96,61	85,33	98,64	96,34
Durchgang 2	94,93	23,88	94,41	69,15	95,24	87,22	87,97
Durchgang 3	97,06	27,58	93,57	84,87	86,20	95,15	97,26
Mittelwert	95,92	30,61	93,52	83,54	88,92	93,67	93,86
Stabw	1,07	8,66	0,92	13,78	5,49	5,85	5,12
t-Test gegen WT		0,005	0,043	0,259	0,153	0,576	0,560
t-Test gegen rev3-2			0,006	0,008	0,001	0,001	0,001

10 µg/ml MMC	WT	rev3-2	rev3-2::REV3#1	-#2	-#3	-#4	WT::REV3#1
Durchgang 1	88,11	29,79	87,73	91,25	79,36	83,34	86,66
Durchgang 2	80,64	21,61	76,00	82,33	80,09	84,04	75,51
Durchgang 3	86,49	22,79	82,77	70,28	69,83	80,50	71,58
Mittelwert	85,08	24,73	82,17	81,29	76,43	82,63	77,92
Stabw	3,93	4,42	5,89	10,52	5,73	1,88	7,82
t-Test gegen WT		0,000	0,521	0,606	0,106	0,404	0,253
t-Test gegen rev3-2			0,000	0,005	0,000	0,000	0,002

15 µg/ml MMC	WT	rev3-2	rev3-2::REV3#1	-#2	-#3	-#4	WT::REV3#1
Durchgang 1	75,66	12,60	73,09	77,29	75,88	71,59	61,52
Durchgang 2	60,18	16,30	66,82	87,32	68,63	71,85	47,90
Durchgang 3	75,59	11,57	71,37	56,45	67,84	67,76	48,83
Mittelwert	70,48	13,49	70,42	73,69	70,78	70,40	52,75
Stabw	8,92	2,48	3,24	15,75	4,43	2,29	7,61
t-Test gegen WT		0,005	0,993	0,778	0,961	0,990	0,060
t-Test gegen rev3-2			0,000	0,020	0,000	0,000	0,007

20 µg/ml MMC	WT	rev3-2	rev3-2::REV3#1	-#2	-#3	-#4	WT::REV3#1
Durchgang 1	39,03	7,66	63,21	33,67	43,79	38,82	40,53
Durchgang 2	53,94	15,38	58,16	69,70	48,35	70,23	67,38
Durchgang 3	50,55	11,67	41,43	37,70	48,72	52,82	37,94
Mittelwert	47,84	11,57	54,27	47,02	46,95	53,96	48,61
Stabw	7,82	3,86	11,40	19,74	2,75	15,73	16,30
t-Test gegen WT		0,006	0,471	0,951	0,867	0,590	0,946
t-Test gegen rev3-2			0,015	0,085	0,000	0,037	0,052

**Tabelle A.11: Daten der Komplementationstudien mit MMS-Behandlung: Wildtyp-Konstrukt.** Aufgeführt ist das zur unbehandelten Probe der jeweiligen Linie relative Frischgewicht.

<b>40 ppm MMS</b>	<b>WT</b>	<b>rev3-2</b>	<b>rev3-2::REV3#1</b>	<b>-#2</b>	<b>-#3</b>	<b>-#4</b>	<b>WT::REV3#1</b>
Durchgang 1	93,65	79,58	87,77	94,82	98,81	90,75	92,79
Durchgang 2	88,02	68,99	83,35	91,1	91,45	97,41	92,4
Durchgang 3	96,07	66,81	87,29	93,59	92,07	99,62	96,83
Mittelwert	92,58	71,8	86,14	93,17	94,11	95,93	94,01
Stabw	4,13	6,83	2,43	1,89	4,08	4,62	2,45
t-Test gegen WT		0,017	0,096	0,838	0,672	0,403	0,640
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,055	0,026	0,014	0,010	0,020

<b>60 ppm MMS</b>	<b>WT</b>	<b>rev3-2</b>	<b>rev3-2::REV3#1</b>	<b>-#2</b>	<b>-#3</b>	<b>-#4</b>	<b>WT::REV3#1</b>
Durchgang 1	62,64	59,46	74,31	72,36	94,92	78,4	80,49
Durchgang 2	71,58	53,13	74,51	79,98	89,11	81,02	77,4
Durchgang 3	74,51	56,08	79,13	85,36	78,3	75,51	84,15
Mittelwert	69,57	56,22	75,98	79,23	87,44	78,31	80,68
Stabw	6,18	3,17	2,72	6,53	8,43	2,75	3,38
t-Test gegen WT		0,045	0,207	0,137	0,046	0,119	0,070
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,001	0,013	0,014	0,001	0,001

<b>80 ppm MMS</b>	<b>WT</b>	<b>rev3-2</b>	<b>rev3-2::REV3#1</b>	<b>-#2</b>	<b>-#3</b>	<b>-#4</b>	<b>WT::REV3#1</b>
Durchgang 1	52,71	18,03	49,37	70,39	69,69	61,06	56,54
Durchgang 2	63,58	17,94	59,08	68,81	77,94	69,5	69,53
Durchgang 3	59,01	20,35	43,67	60,82	68,36	74,35	69,72
Mittelwert	58,43	18,77	50,71	66,67	72	68,3	65,27
Stabw	5,46	1,36	7,79	5,13	5,19	6,73	7,56
t-Test gegen WT		0,004	0,240	0,130	0,036	0,123	0,279
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,017	0,002	0,002	0,005	0,007

<b>100 ppm MMS</b>	<b>WT</b>	<b>rev3-2</b>	<b>rev3-2::REV3#1</b>	<b>-#2</b>	<b>-#3</b>	<b>-#4</b>	<b>WT::REV3#1</b>
Durchgang 1	47,29	6,97	43,49	50,57	49,82	40,9	38,94
Durchgang 2	43,2	9,46	53,59	52,06	41,39	54,6	50,34
Durchgang 3	48,86	7,07	41,97	41,91	39,11	55,94	57,95
Mittelwert	46,45	7,84	46,35	48,18	43,44	50,48	49,08
Stabw	2,92	1,41	6,32	5,48	5,64	8,33	9,57
t-Test gegen WT		0,000	0,981	0,662	0,472	0,498	0,688
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,007	0,004	0,006	0,011	0,016

**Tabelle A.12: Daten der Komplementationstudien mit Cisplatin-Behandlung: Wildtyp-Konstrukt.** Aufgeführt ist das zur unbehandelten Probe der jeweiligen Linie relative Frischgewicht.

<b>5 <math>\mu</math>M Cisplatin</b>	<b>WT</b>	<b><i>rev3-2</i></b>	<b><i>rev3-2::REV3#1</i></b>	<b>-#2</b>	<b>-#3</b>	<b>-#4</b>	<b>WT::REV3#1</b>
Durchgang 1	115,23	43,32	100,03	98,27	119,08	120,58	80,63
Durchgang 2	105,62	44,52	91,36	95,93	96,34	121,54	88,45
Durchgang 3	90,93	40,27	93,21	80,78	88,37	86,69	87,40
Mittelwert	103,93	42,70	94,87	91,66	101,26	109,60	85,49
Stabw	12,24	2,19	4,57	9,50	15,93	19,85	4,24
t-Test gegen WT		0,011	0,329	0,246	0,830	0,699	0,109
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,000	0,009	0,022	0,027	0,001

<b>10 <math>\mu</math>M Cisplatin</b>	<b>WT</b>	<b><i>rev3-2</i></b>	<b><i>rev3-2::REV3#1</i></b>	<b>-#2</b>	<b>-#3</b>	<b>-#4</b>	<b>WT::REV3#1</b>
Durchgang 1	103,54	21,25	94,48	100,40	111,91	122,79	100,83
Durchgang 2	91,52	18,37	85,30	97,31	90,78	118,95	84,15
Durchgang 3	78,77	23,59	91,84	86,26	88,91	91,35	79,33
Mittelwert	91,28	21,07	90,54	94,66	97,20	111,03	88,10
Stabw	12,39	2,61	4,73	7,43	12,77	17,15	11,28
t-Test gegen WT		0,008	0,930	0,710	0,595	0,188	0,760
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,000	0,001	0,007	0,011	0,007







**Tabelle A.16: Daten der Komplementationstudien mit MMC-Behandlung: Punktmutationskonstrukt Motiv C.** Aufgeführt ist das zur unbehandelten Probe der jeweiligen Linie relative Frischgewicht.

5 µg/ml MMC	WT	rev3-2	rev3-2::REV3				WT::REV3	
			D1549A#1	-#2	-#3	-#4	D1549A#1	
Durchgang 1	83,40	21,82	28,98	39,00	53,13	65,54	85,32	
Durchgang 2	84,94	34,86	33,74	52,31	48,41	55,25	89,84	
Durchgang 3	92,71	33,32	42,18	68,31	58,68	80,50	84,12	
Durchgang 4	104,43	35,01	32,43	70,96	42,27	69,38	100,43	
Mittelwert	94,03	34,40	36,12	63,86	49,79	68,38	91,47	
Stabw	9,81	0,94	5,29	10,09	8,29	12,65	8,28	
t-Test gegen WT		0,000	0,000	0,004	0,001	0,016	0,666	
t-Test gegen rev3-2			0,494	0,031	0,006	0,002	0,000	
t-Test gegen -#4							0,016	

10 µg/ml MMC	WT	rev3-2	rev3-2::REV3				WT::REV3	
			D1549A#1	-#2	-#3	-#4	D1549A#1	
Durchgang 1	67,25	18,74	19,65	19,44	23,46	50,72	67,85	
Durchgang 2	74,04	25,12	19,48	38,14	40,97	58,50	79,98	
Durchgang 3	75,92	19,44	31,00	54,14	41,70	61,42	76,54	
Durchgang 4	73,00	29,90	28,49	55,65	22,38	57,27	80,24	
Mittelwert	74,32	24,82	26,33	49,31	35,02	59,06	78,92	
Stabw	1,48	5,24	6,06	9,70	10,95	2,13	2,07	
t-Test gegen WT		0,000	0,000	0,021	0,003	0,002	0,132	
t-Test gegen rev3-2			0,745	0,113	0,205	0,000	0,000	
t-Test gegen -#4							0,002	

15 µg/ml MMC	WT	rev3-2	rev3-2::REV3				WT::REV3	
			D1549A#1	-#2	-#3	-#4	D1549A#1	
Durchgang 1	57,28	14,92	18,54	17,91	23,41	43,01	56,50	
Durchgang 2	58,48	17,90	20,49	20,29	24,22	43,68	62,56	
Durchgang 3	53,98	18,84	25,52	44,15	27,16	36,76	64,14	
Durchgang 4	46,60	22,36	20,06	35,44	17,68	44,53	70,18	
Mittelwert	53,02	19,70	22,02	33,29	23,02	41,66	65,62	
Stabw	6,00	2,35	3,03	12,07	4,85	4,27	4,02	
t-Test gegen WT		0,000	0,000	0,057	0,000	0,012	0,177	
t-Test gegen rev3-2			0,265	0,178	0,118	0,000	0,000	
t-Test gegen -#4							0,001	

20 µg/ml MMC	WT	rev3-2	rev3-2::REV3				WT::REV3	
			D1549A#1	-#2	-#3	-#4	D1549A#1	
Durchgang 1	38,94	12,81	13,56	13,75	12,84	22,26	46,46	
Durchgang 2	58,48	19,71	13,99	24,97	21,60	33,72	63,82	
Durchgang 3	49,92	14,10	14,04	24,00	26,89	45,54	65,49	
Durchgang 4	46,76	15,46	16,44	23,45	15,55	33,15	59,25	
Mittelwert	51,72	16,42	14,82	24,14	21,35	37,47	62,85	
Stabw	6,07	2,93	1,40	0,77	5,67	6,99	3,23	
t-Test gegen WT		0,002	0,003	0,001	0,002	0,056	0,022	
t-Test gegen rev3-2			0,569	0,105	0,344	0,026	0,001	
t-Test gegen -#4							0,008	









**Tabelle A.20: Daten der Komplementationstudien mit UV-B-Bestrahlung: Punktmutationskonstrukt Motiv A.** Aufgeführt sind die zum Wildtyp relativen Wurzellängen der Komplementationlinien.

0 kJ/m <sup>2</sup>	WT	<i>rev3-2::REV3</i>					<i>WT::REV3</i>
		<i>rev3-2</i>	D1385A#1	-#2	-#3	-#4	D1385A#1
Durchgang 1	100,00	91,67	113,18	110,66	80,15	84,25	102,14
Durchgang 2	100,00	93,90	101,77	82,54	56,85	97,64	65,59
Durchgang 3	100,00	94,21	95,53	78,26	70,87	79,83	95,79
Durchgang 4	100,00	87,04					
Durchgang 5	100,00	82,74					
Mittelwert	100,00	89,91	103,50	90,48	69,29	87,24	87,84
Stabw	0,00	4,93	8,95	17,60	11,73	9,27	19,53
t-Test gegen WT		0,010	0,569	0,448	0,045	0,140	0,394
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,102	0,961	0,081	0,679	0,872
t-Test gegen -#4							0,965

5 kJ/m <sup>2</sup>	WT	<i>rev3-2::REV3</i>					<i>WT::REV3</i>
		<i>rev3-2</i>	D1385A#1	-#2	-#3	-#4	D1385A#1
Durchgang 1	100,00	23,28	33,24	17,46	45,68	50,74	58,96
Durchgang 2	100,00	23,02	26,18	64,24	32,25	52,03	96,94
Durchgang 3	100,00	43,27	52,83	18,36	31,51	29,46	106,78
Durchgang 4	100,00	33,27					
Durchgang 5	100,00	26,03					
Mittelwert	100,00	29,77	37,41	33,35	36,48	44,08	87,56
Stabw	0,00	8,60	13,81	26,75	7,98	12,67	25,26
t-Test gegen WT		0,000	0,016	0,050	0,005	0,017	0,484
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,452	0,841	0,318	0,178	0,050
t-Test gegen -#4							0,077

7 kJ/m <sup>2</sup>	WT	<i>rev3-2::REV3</i>					<i>WT::REV3</i>
		<i>rev3-2</i>	D1385A#1	-#2	-#3	-#4	D1385A#1
Durchgang 1	100,00	19,82	44,14	25,7	29,66	14,45	97,62
Durchgang 2	100,00	25,80	23,19	44,56	21,26	35,49	157,17
Durchgang 3	100,00	19,96	27,83	19,47	19,11	15,53	85,14
Durchgang 4	100,00	22,11					
Durchgang 5	100,00	18,84					
Mittelwert	100,00	21,31	31,72	29,91	23,34	21,83	113,31
Stabw	0,00	2,78	11,00	13,06	5,57	11,85	38,49
t-Test gegen WT		0,000	0,009	0,011	0,002	0,008	0,610
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,240	0,372	0,602	0,947	0,053
t-Test gegen -#4							0,044

**Tabelle A.21: Daten der Komplementationstudien mit UV-B-Bestrahlung: Punktmutationskonstrukt Motiv C.** Aufgeführt sind die zum Wildtyp relativen Wurzellängen der Komplementationlinien.

0 kJ/m <sup>2</sup>	WT	<i>rev3-2::REV3</i>					<i>WT::REV3</i>
		<i>rev3-2</i>	D1549A#1	-#2	-#3	-#4	D1549A#1
Durchgang 1	100,00	91,67	82,44	101,32	98,13	86,49	93,30
Durchgang 2	100,00	93,90	92,40	93,89	96,35	100,06	92,35
Durchgang 3	100,00	94,21	81,93	87,85	96,96	109,27	100,32
Durchgang 4	100,00	87,04					
Durchgang 5	100,00	82,74					
Mittelwert	100,00	89,91	85,59	94,35	97,15	98,61	95,32
Stabw	0,00	4,93	5,90	6,75	0,90	11,46	4,35
t-Test gegen WT		0,010	0,052	0,284	0,032	0,853	0,204
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,351	0,388	0,029	0,318	0,169
t-Test gegen -#4							0,679

5 kJ/m <sup>2</sup>	WT	<i>rev3-2::REV3</i>					<i>WT::REV3</i>
		<i>rev3-2</i>	D1549A#1	-#2	-#3	-#4	D1549A#1
Durchgang 1	100,00	23,28	38,33	61,98	65,77	69,26	94,13
Durchgang 2	100,00	23,02	21,00	40,97	41,06	84,78	94,14
Durchgang 3	100,00	43,27	13,19	66,93	51,53	67,16	64,77
Durchgang 4	100,00	33,27					
Durchgang 5	100,00	26,03					
Mittelwert	100,00	29,77	24,17	56,62	52,78	73,73	84,35
Stabw	0,00	8,60	12,87	13,78	12,40	9,62	16,95
t-Test gegen WT		0,000	0,009	0,032	0,022	0,042	0,251
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,550	0,057	0,062	0,003	0,019
t-Test gegen -#4							0,412

7 kJ/m <sup>2</sup>	WT	<i>rev3-2::REV3</i>					<i>WT::REV3</i>
		<i>rev3-2</i>	D1549A#1	-#2	-#3	-#4	D1549A#1
Durchgang 1	100,00	19,82	19,89	59,18	47,85	68,89	102,02
Durchgang 2	100,00	25,80	34,81	30,29	58,04	42,40	47,93
Durchgang 3	100,00	19,96	16,78	37,60	55,91	83,82	71,31
Durchgang 4	100,00	22,11					
Durchgang 5	100,00	18,84					
Mittelwert	100,00	21,31	23,83	42,36	53,94	65,04	73,75
Stabw	0,00	2,78	9,64	15,02	5,37	20,98	27,13
t-Test gegen WT		0,000	0,005	0,022	0,005	0,102	0,236
t-Test gegen <i>rev3-2</i>			0,698	0,133	0,004	0,067	0,078
t-Test gegen -#4							0,684

**Tabelle A.22: Daten der Sensitivitätstests mit MMC-Behandlung: *rev3 recq4a-4* Doppelmutanten und Einzelmutanten.** Aufgeführt ist das zur unbehandelten Probe der jeweiligen Linie relative Frischgewicht.

5 µg/ml MMC	WT				<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>
Durchgang 1	92,39	41,77	39,44	77,28	42,91	40,98
Durchgang 2	85,08	28,55	27,65	86,70	32,93	32,59
Durchgang 3	100,88	49,43	47,08	95,39	44,44	45,38
Durchgang 4	81,59	23,50	29,44			
Durchgang 5	97,51	29,44	30,55			
Mittelwert	91,49	34,54	34,83	86,45	40,09	39,65
Stabw	8,13	10,70	8,22	9,06	6,25	6,50
t-Test gegen WT		0,000	0,000	0,474	0,000	0,000
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,390	0,399
t-Test gegen <i>recq4a-4</i>		0,001	0,001		0,003	0,003

10 µg/ml MMC	WT				<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>
Durchgang 1	74,48	33,71	31,74	80,46	35,67	33,62
Durchgang 2	67,29	23,61	22,45	62,04	24,55	22,89
Durchgang 3	86,46	32,38	37,72	81,60	35,58	39,75
Durchgang 4	62,08	15,79	22,68			
Durchgang 5	80,49	26,81	29,42			
Mittelwert	74,16	26,46	28,80	74,70	31,93	32,09
Stabw	9,81	7,24	6,45	10,98	6,40	8,54
t-Test gegen WT		0,000	0,000	0,948	0,000	0,002
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,317	0,601
t-Test gegen <i>recq4a-4</i>		0,006	0,008		0,008	0,007

15 µg/ml MMC	WT				<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>
Durchgang 1	50,42	8,56	7,83	57,67	9,77	8,19
Durchgang 2	36,22	4,81	3,94	29,21	7,26	4,35
Durchgang 3	64,02	10,67	11,31	50,95	9,20	12,03
Durchgang 4	26,60	2,03	3,86			
Durchgang 5	54,69	4,22	6,87			
Mittelwert	46,39	6,06	6,76	45,94	8,75	8,19
Stabw	14,93	3,49	3,09	14,88	1,32	3,84
t-Test gegen WT		0,003	0,003	0,969	0,005	0,003
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,177	0,617
t-Test gegen <i>recq4a-4</i>		0,040	0,042		0,048	0,041

20 µg/ml MMC	WT				<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>
Durchgang 1	42,54	6,59	8,18	40,59	9,19	7,70
Durchgang 2	31,72	4,07	4,08	22,59	3,97	3,46
Durchgang 3	56,80	8,09	8,06	56,90	7,32	8,63
Durchgang 4	21,96	1,41	2,88			
Durchgang 5	41,78	3,57	5,39			
Mittelwert	38,96	4,75	5,72	40,03	6,82	6,59
Stabw	13,04	2,62	2,37	17,16	2,65	2,76
t-Test gegen WT		0,004	0,004	0,931	0,004	0,004
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,338	0,673
t-Test gegen <i>recq4a-4</i>		0,069	0,073		0,075	0,074

**Tabelle A.23: Daten der Sensitivitätstests mit MMC-Behandlung: *rev3 mus81-1* und *rev3 atr-2* Doppelmutanten und Einzelmutanten.** Aufgeführt ist das zur unbehandelten Probe der jeweiligen Linie relative Frischgewicht.

2,5 µg/ml MMC	WT			<i>rev3-3</i>		<i>rev3-5</i>			
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>atr-2</i>	<i>atr-2</i>	<i>atr-2</i>
Durchgang 1	96,92	43,89	59,62	53,33	50,46	45,57	60,80	27,08	31,15
Durchgang 2	98,94	51,53	48,99	51,44	38,02	36,70	48,66	25,65	28,00
Durchgang 3	100,04	54,03	47,94	64,51	47,56	47,76	43,50	36,13	44,31
Mittelwert	98,63	49,82	52,18	56,43	45,35	43,34	50,99	29,62	34,49
Stabw	1,58	5,29	6,46	7,06	6,51	5,85	8,88	5,69	8,65
t-Test gegen WT		0,002	0,004	0,007	0,003	0,002	0,010	0,001	0,005
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,410	0,155		0,011	0,051
t-Test gegen <i>mus81-1</i>		0,269	0,486		0,117	0,071			
t-Test gegen <i>atr-2</i>		0,856	0,860					0,032	0,083

5 µg/ml MMC	WT			<i>rev3-3</i>		<i>rev3-5</i>			
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>atr-2</i>	<i>atr-2</i>	<i>atr-2</i>
Durchgang 1	89,88	39,84	53,40	31,91	43,27	37,83	42,03	20,67	20,00
Durchgang 2	99,77	39,25	57,20	38,27	31,97	35,05	46,25	27,78	31,07
Durchgang 3	100,62	39,34	37,63	39,34	58,16	40,60	31,10	32,52	28,87
Durchgang 4	92,58	34,36	29,00	36,34	34,87	40,42	34,46	20,98	23,81
Durchgang 5	97,94	34,08	34,17	29,55	30,26	23,78	27,74	15,00	18,61
Durchgang 6	92,35	47,96	36,65	39,96	36,29	30,07	31,27	23,00	25,16
Mittelwert	95,52	39,14	41,34	35,90	39,14	34,62	35,47	23,33	24,59
Stabw	4,48	5,04	11,28	4,25	10,35	6,95	7,17	6,10	4,86
t-Test gegen WT		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
t-Test gegen <i>rev3</i>					1,000	0,243		0,001	0,013
t-Test gegen <i>mus81-1</i>		0,257	0,308		0,502	0,702			
t-Test gegen <i>atr-2</i>		0,332	0,312					0,010	0,025

10 µg/ml MMC	WT			<i>rev3-3</i>		<i>rev3-5</i>			
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>atr-2</i>	<i>atr-2</i>	<i>atr-2</i>
Durchgang 1	72,78	32,48	28,35	25,77	26,57	28,78	16,30	17,18	16,75
Durchgang 2	86,73	30,11	43,31	23,32	27,38	27,99	25,23	24,17	24,66
Durchgang 3	90,62	28,19	32,13	32,30	31,40	27,29	23,33	23,78	31,75
Durchgang 4	82,31	8,73	6,34	12,82	11,94	9,48	6,85	2,93	3,72
Durchgang 5	77,24	7,63	7,78	6,49	6,69	4,74	4,60	2,09	2,85
Durchgang 6	79,78	16,04	10,21	10,55	9,54	8,62	6,12	5,11	4,49
Mittelwert	81,58	20,53	21,35	18,54	18,92	17,82	13,74	12,54	14,04
Stabw	6,45	11,13	15,37	10,06	10,70	11,59	9,16	10,39	12,30
t-Test gegen WT		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,804	0,660		0,228	0,385
t-Test gegen <i>mus81-1</i>		0,752	0,717		0,951	0,909			
t-Test gegen <i>atr-2</i>		0,276	0,327					0,837	0,926

15 µg/ml MMC	WT			<i>rev3-3</i>		<i>rev3-5</i>			
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>atr-2</i>	<i>atr-2</i>	<i>atr-2</i>
Durchgang 1	37,14	1,83	7,74	4,53	6,16	6,45	2,19	2,36	2,44
Durchgang 2	71,87	6,84	9,65	5,10	5,91	6,16	5,14	4,78	3,87
Durchgang 3	55,07	6,63	6,98	6,02	8,02	6,56	3,74	3,47	4,74
Durchgang 4	75,16	8,55	7,32	7,67	10,57	6,56	5,95	3,82	3,58
Durchgang 5	65,38	6,93	6,61	6,73	6,77	4,47	4,38	1,63	2,54
Durchgang 6	57,69	12,27	9,86	10,28	8,38	6,71	5,44	3,99	3,95
Mittelwert	60,39	7,17	8,03	6,72	7,64	6,15	4,47	3,34	3,52
Stabw	13,79	3,37	1,39	2,07	1,74	0,89	1,37	1,15	0,89
t-Test gegen WT		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,773	0,022		0,038	0,000
t-Test gegen <i>mus81-1</i>		0,787	0,233		0,427	0,554			
t-Test gegen <i>atr-2</i>		0,115	0,001					0,153	0,310

**Tabelle A.24: Daten der Sensitivitätstests mit MMS-Behandlung: *rev3 recq4a-4* Doppelmutanten und Einzelmutanten.** Aufgeführt ist das zur unbehandelten Probe der jeweiligen Linie relative Frischgewicht.

40 ppm MMS	WT				<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>
Durchgang 1	85,14	83,58	79,15	69,77	55,09	50,55
Durchgang 2	91,64	87,08	73,43	89,62	27,57	20,66
Durchgang 3	79,12	68,13	74,94	73,34	61,58	65,36
Mittelwert	85,30	79,60	75,84	77,58	48,08	45,52
Stabw	6,26	10,08	2,97	10,58	18,06	22,77
t-Test gegen WT		0,461	0,104	0,351	0,058	0,085
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,074	0,145
t-Test gegen <i>recq4a-4</i>		0,823	0,807		0,086	0,120

60 ppm MMS	WT				<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>
Durchgang 1	72,62	53,91	49,74	56,36	19,16	17,83
Durchgang 2	70,51	53,47	41,84	57,91	7,68	7,52
Durchgang 3	61,53	59,48	56,89	58,14	33,82	23,73
Mittelwert	68,22	55,62	49,49	57,47	20,22	16,36
Stabw	5,89	3,35	7,52	0,97	13,10	8,21
t-Test gegen WT		0,045	0,030	0,084	0,013	0,001
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,036	0,007
t-Test gegen <i>recq4a-4</i>		0,443	0,206		0,038	0,012

80 ppm MMS	WT				<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>
Durchgang 1	37,61	14,27	14,01	7,14	1,87	1,62
Durchgang 2	29,43	10,24	8,91	37,39	0,22	0,68
Durchgang 3	17,51	18,76	16,89	11,98	3,70	2,25
Mittelwert	28,19	14,43	13,27	18,84	1,93	1,52
Stabw	10,11	4,26	4,04	16,25	1,74	0,79
t-Test gegen WT		0,129	0,111	0,454	0,043	0,044
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,024	0,033
t-Test gegen <i>recq4a-4</i>		0,689	0,617		0,212	0,206



**Tabelle A.25: Daten der Sensitivitätstests mit MMS-Behandlung: *rev3 mus81-1* und *rev3 atr-2* Doppelmutanten und Einzelmutanten.** Aufgeführt ist das zur unbehandelten Probe der jeweiligen Linie relative Frischgewicht.

<b>40 ppm MMS</b>	<b>WT</b>	<b><i>rev3-3</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b>	<b><i>mus81-1</i></b>	<b><i>rev3-3</i></b> <b><i>mus81-1</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b> <b><i>mus81-1</i></b>	<b><i>atr-2</i></b>	<b><i>rev3-3</i></b> <b><i>atr-2</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b> <b><i>atr-2</i></b>
Durchgang 1	91,93	77,40	90,40	31,84	40,09	30,26	78,49	29,14	27,78
Durchgang 2	89,88	72,31	79,08	36,23	36,78	41,54	62,64	23,15	27,93
Durchgang 3	99,25	96,24	75,33	35,08	44,23	32,77	74,20	27,83	39,42
Mittelwert	93,69	81,98	81,60	34,38	40,37	34,86	71,78	26,71	31,71
Stabw	4,92	12,61	7,84	2,28	3,73	5,92	8,20	3,15	6,68
t-Test gegen WT		0,245	0,099	0,000	0,000	0,000	0,024	0,000	0,000
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,022	0,002		0,013	0,001
t-Test gegen <i>mus81-1</i>		0,020	0,006		0,090	0,907			
t-Test gegen <i>atr-2</i>		0,315	0,208					0,005	0,003

<b>60 ppm MMS</b>	<b>WT</b>	<b><i>rev3-3</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b>	<b><i>mus81-1</i></b>	<b><i>rev3-3</i></b> <b><i>mus81-1</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b> <b><i>mus81-1</i></b>	<b><i>atr-2</i></b>	<b><i>rev3-3</i></b> <b><i>atr-2</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b> <b><i>atr-2</i></b>
Durchgang 1	80,24	66,22	71,02	20,31	24,69	20,38	30,55	13,21	10,60
Durchgang 2	71,39	41,31	44,35	22,19	18,47	25,94	33,31	10,53	9,75
Durchgang 3	78,45	45,67	48,28	24,32	26,48	22,49	37,78	16,90	15,84
Mittelwert	76,69	51,07	54,55	22,27	23,21	22,94	33,88	13,54	12,06
Stabw	4,68	13,31	14,40	2,01	4,20	2,81	3,65	3,20	3,30
t-Test gegen WT		0,066	0,105	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,057	0,058		0,033	0,031
t-Test gegen <i>mus81-1</i>		0,061	0,058		0,750	0,756			
t-Test gegen <i>atr-2</i>		0,147	0,123					0,002	0,002

<b>80 ppm MMS</b>	<b>WT</b>	<b><i>rev3-3</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b>	<b><i>mus81-1</i></b>	<b><i>rev3-3</i></b> <b><i>mus81-1</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b> <b><i>mus81-1</i></b>	<b><i>atr-2</i></b>	<b><i>rev3-3</i></b> <b><i>atr-2</i></b>	<b><i>rev3-5</i></b> <b><i>atr-2</i></b>
Durchgang 1	42,74	16,88	20,62	4,44	3,42	2,34	3,84	0,99	0,82
Durchgang 2	34,30	6,41	10,06	3,25	2,14	4,06	3,48	0,75	0,72
Durchgang 3	45,96	7,64	8,28	3,29	3,53	2,87	4,94	1,53	1,25
Mittelwert	41,00	10,31	12,99	3,66	3,03	3,09	4,09	1,09	0,93
Stabw	6,02	5,72	6,67	0,67	0,77	0,88	0,76	0,40	0,28
t-Test gegen WT		0,003	0,006	0,008	0,008	0,007	0,008	0,007	0,007
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,156	0,122		0,107	0,088
t-Test gegen <i>mus81-1</i>		0,180	0,135		0,347	0,930			
t-Test gegen <i>atr-2</i>		0,198	0,145					0,009	0,011

**Tabelle A.26: Daten der Sensitivitätstests mit Cisplatin-Behandlung: *rev3 recq4a-4* Doppelmutanten und Einzelmutanten.** Aufgeführt ist das zur unbehandelten Probe der jeweiligen Linie relative Frischgewicht.

5 µM Cisplatin	WT				<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>
Durchgang 1	102,55	55,02	49,57	47,07	23,65	26,28
Durchgang 2	94,20	47,46	29,04	55,89	18,91	18,94
Durchgang 3	104,03	60,52	60,72	69,78	28,08	27,30
Mittelwert	100,26	54,33	46,44	57,58	23,55	24,18
Stabw	5,30	6,56	16,07	11,45	4,59	4,56
t-Test gegen WT		0,001	0,020	0,012	0,000	0,000
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,004	0,130
t-Test gegen <i>recq4a-4</i>		0,697	0,389		0,023	0,025

10 µM Cisplatin	WT				<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>	<i>recq4a-4</i>
Durchgang 1	91,86	26,44	23,71	15,39	3,31	19,40
Durchgang 2	82,61	21,97	14,60	19,67	16,38	16,81
Durchgang 3	92,38	33,70	32,47	27,13	22,58	16,23
Mittelwert	88,95	27,37	23,59	20,73	14,09	17,48
Stabw	5,50	5,92	8,93	5,94	9,84	1,69
t-Test gegen WT		0,000	0,001	0,000	0,001	0,001
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,131	0,357
t-Test gegen <i>recq4a-4</i>		0,242	0,671		0,385	0,447

**Tabelle A.27: Daten der Sensitivitätstests mit Cisplatin-Behandlung: *rev3 mus81-1* und *rev3 atr-2* Doppelmutanten und Einzelmutanten.** Aufgeführt ist das zur unbehandelten Probe der jeweiligen Linie relative Frischgewicht.

5 µM Cisplatin	WT				<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>atr-2</i>	<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>			
Durchgang 1	117,26	59,86	62,74	63,59	31,82	35,13	44,73	24,48	20,55
Durchgang 2	98,50	46,08	61,63	71,75	28,11	38,45	71,34	22,81	18,09
Durchgang 3	95,56	56,54	50,09	64,40	51,37	42,20	68,44	22,92	26,43
Mittelwert	103,77	54,16	58,15	66,58	37,10	38,60	61,50	23,40	21,69
Stabw	11,77	7,19	7,01	4,50	12,50	3,53	14,60	0,93	4,28
t-Test gegen WT		0,006	0,008	0,021	0,003	0,007	0,019	0,007	0,003
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,127	0,024		0,016	0,003
t-Test gegen <i>mus81-1</i>		0,076	0,167		0,042	0,001			
t-Test gegen <i>atr-2</i>		0,493	0,745				0,045	0,034	

10 µM Cisplatin	WT				<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>atr-2</i>	<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>
		<i>rev3-3</i>	<i>rev3-5</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1</i>			
Durchgang 1	102,87	33,76	37,97	28,24	24,71	20,07	22,78	14,20	13,18
Durchgang 2	99,04	30,22	26,92	40,92	17,51	22,80	31,05	16,65	18,56
Durchgang 3	102,36	24,82	26,54	27,18	33,58	26,07	32,72	17,25	23,80
Mittelwert	101,42	29,60	30,48	32,11	25,27	22,98	28,85	16,03	18,51
Stabw	2,08	4,50	6,49	7,65	8,05	3,00	5,33	1,62	5,31
t-Test gegen WT		0,000	0,001	0,002	0,002	0,000	0,001	0,000	0,000
t-Test gegen <i>rev3</i>					0,473	0,173		0,024	0,071
t-Test gegen <i>mus81-1</i>		0,655	0,792		0,346	0,164			
t-Test gegen <i>atr-2</i>		0,862	0,755				0,043	0,076	

# Literaturverzeichnis

- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C., und Ecker, J. R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of arabidopsis thaliana. *Science*, 301(5633):653–657.
- Álvarez-Quilón, A., Serrano-Benítez, A., Lieberman, J. A., Quintero, C., Sánchez-Gutiérrez, D., Escudero, L. M., und Cortés-Ledesma, F. (2014). Atm specifically mediates repair of double-strand breaks with blocked dna ends. *Nature communications*, 5.
- Assaad, F. F. und Signer, E. R. (1992). Somatic and germinal recombination of a direct repeat in arabidopsis. *Genetics*, 132(2):553–566.
- Astatke, M., Grindley, N. D., und Joyce, C. M. (1998). How *E. coli* dna polymerase  $\epsilon$  (klenow fragment) distinguishes between deoxy- and dideoxynucleotides. *Journal of molecular biology*, 278(1):147–165.
- Atkinson, J. und McGlynn, P. (2009). Replication fork reversal and the maintenance of genome stability. *Nucleic acids research*, 37(11):3475–3492.
- Barber, L. J., Youds, J. L., Ward, J. D., McIlwraith, M. J., O’Neil, N. J., Petalcorin, M. I., Martin, J. S., Collis, S. J., Cantor, S. B., Auclair, M., *et al.* (2008). Rtel1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. *Cell*, 135(2):261–271.
- Bartek, J. und Lukas, J. (2003). Chk1 and chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer cell*, 3(5):421–429.
- Becker, P. B. und Hörz, W. (2002). Atp-dependent nucleosome remodeling. *Annual review of biochemistry*, 71(1):247–273.
- Bemark, M., Khamlichi, A. A., Davies, S. L., und Neuberger, M. S. (2000). Disruption of mouse polymerase  $\zeta$  (rev3) leads to embryonic lethality and impairs blastocyst development in vitro. *Current Biology*, 10(19):1213–1216.
- Berchowitz, L. E., Francis, K. E., Bey, A. L., und Copenhaver, G. P. (2007). The role of atmus81 in interference-insensitive crossovers in a. thaliana. *PLoS genetics*, 3(8):e132.

- Bernad, A., Lazaro, J. M., Salas, M., und Blanco, L. (1990). The highly conserved amino acid sequence motif tyr-gly-asp-thr-asp-ser in alpha-like dna polymerases is required by phage phi 29 dna polymerase for protein-primed initiation and polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12):4610–4614.
- Berti, M., Chaudhuri, A. R., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R., *et al.* (2013). Human recq1 promotes restart of replication forks reversed by dna topoisomerase i inhibition. *Nature structural & molecular biology*, 20(3):347–354.
- Bétous, R., Mason, A. C., Rambo, R. P., Bansbach, C. E., Badu-Nkansah, A., Sirbu, B. M., Eichman, B. F., und Cortez, D. (2012). Smarcal1 catalyzes fork regression and holliday junction migration to maintain genome stability during dna replication. *Genes & development*, 26(2):151–162.
- 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. *Molecular and cellular biology*, 29(24):6427–6437.
- Bienko, M., Green, C. M., Crosetto, N., Rudolf, F., Zapart, G., Coull, B., Kannouche, P., Wider, G., Peter, M., Lehmann, A. R., *et al.* (2005). Ubiquitin-binding domains in y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science*, 310(5755):1821–1824.
- Blastyák, A., Pintér, 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. *Molecular cell*, 28(1):167–175.
- 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*, 5(1):1–12.
- 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. *Molecular and cellular biology*, 20(23):8758–8766.
- Boerkoel, C. F., Takashima, H., John, J., Yan, J., Stankiewicz, P., Rosenbarker, L., André, J.-L., Bogdanovic, R., Burguet, A., Cockfield, S., *et al.* (2002). Mutant chromatin remodeling protein smarcal1 causes schimke immuno-osseous dysplasia. *Nature genetics*, 30(2):215–220.
- Branzei, D. und Foiani, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(3):208–219.
- Broomfield, S., Hryciw, T., und Xiao, W. (2001). Dna postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/DNA Repair*, 486(3):167–184.
- Brown, E. J. und Baltimore, D. (2000). Atr disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes & development*, 14(4):397–402.

- Brun, J., Chiu, R. K., Wouters, B. G., und Gray, D. A. (2010). Regulation of pcna polyubiquitination in human cells. *BMC research notes*, 3(1):85.
- Bugreev, D. V., Yu, X., Egelman, E. H., und Mazin, A. V. (2007). Novel pro-and anti-recombination activities of the bloom syndrome helicase. *Genes & development*, 21(23):3085–3094.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., und Chen, D. J. (2001). Atm phosphorylates histone h2ax in response to dna double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45):42462–42467.
- Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, 9(8):619–631.
- Camerini-Otero, D. R. und Hsieh, P. (1995). Homologous recombination proteins in prokaryotes and eukaryotes. *Annual review of genetics*, 29:509–552.
- Caruthers, J. M. und McKay, D. B. (2002). Helicase structure and mechanism. *Current opinion in structural biology*, 12(1):123–133.
- Champoux, J. J. (2001). Dna topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry*, 70(1):369–413.
- Chaudhuri, A. R., Hashimoto, Y., Herrador, R., Neelsen, K. J., Fachinetti, D., Bermejo, R., Cocito, A., Costanzo, V., und Lopes, M. (2012). Topoisomerase i poisoning results in parp-mediated replication fork reversal. *Nature structural & molecular biology*, 19(4):417–423.
- Chen, H., Lisby, M., und Symington, L. S. (2013). Rpa coordinates dna end resection and prevents formation of dna hairpins. *Molecular cell*, 50(4):589–600.
- Chen, I.-P., Mannuss, A., Orel, N., Heitzeberg, F., und Puchta, H. (2008a). A homolog of scrad5 is involved in dna repair and homologous recombination in arabidopsis. *Plant physiology*, 146(4):1786–1796.
- Chen, L., Nievera, C. J., Lee, A. Y.-L., und Wu, X. (2008b). Cell cycle-dependent complex formation of brca1·ctip·mrn is important for dna double-strand break repair. *Journal of biological chemistry*, 283(12):7713–7720.
- Chen, X.-B., Melchionna, R., Denis, C.-M., Gaillard, P.-H. L., 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. *Molecular cell*, 8(5):1117–1127.
- Cheok, C. F., Wu, L., Garcia, P. L., Janscak, P., und Hickson, I. D. (2005). The bloom syndrome helicase promotes the annealing of complementary single-stranded dna. *Nucleic acids research*, 33(12):3932–3941.
- Chu, W. K. und Hickson, I. D. (2009). Recq helicases: multifunctional genome caretakers. *Nature Reviews Cancer*, 9(9):644–654.

- Ciccìa, A., Bredemeyer, A. L., Sowa, M. E., Terret, M.-E., Jallepalli, P. V., Harper, J. W., und Elledge, S. J. (2009). The siod disorder protein smarcal1 is an rpa-interacting protein involved in replication fork restart. *Genes & development*, 23(20):2415–2425.
- Ciccìa, A., Nimonkar, A. V., Hu, Y., Hajdu, I., Achar, Y. J., Izhar, L., Petit, S. A., Adamson, B., Yoon, J. C., Kowalczykowski, S. C., *et al.* (2012a). Polyubiquitinated pcna recruits the zranb3 translocase to maintain genomic integrity after replication stress. *Molecular cell*, 47(3):396–409.
- Ciccìa, A., Nimonkar, A. V., Hu, Y., Hajdu, I., Achar, Y. J., Izhar, L., Petit, S. A., Adamson, B., Yoon, J. C., Kowalczykowski, S. C., *et al.* (2012b). The zranb3 translocase associates with poly-ubiquitinated pcna to promote fork restart and limit recombination after replication stress. *Molecular cell*, 47(3):396.
- Cimprich, K. A. und Cortez, D. (2008). Atr: an essential regulator of genome integrity. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(8):616–627.
- Clark, K. A. und Krysan, P. J. (2010). Chromosomal translocations are a common phenomenon in arabidopsis thaliana t-dna insertion lines. *The Plant Journal*, 64(6):990–1001.
- Cleaver, J. (1966). Photoreactivation: A radiation repair mechanism absent from mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 24(4):569–576.
- Clough, S. J. und Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6):735–743.
- Copeland, W. C. und Wang, T. (1993). Mutational analysis of the human dna polymerase alpha. the most conserved region in alpha-like dna polymerases is involved in metal-specific catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15):11028–11040.
- Couch, F. B., Bansbach, C. E., Driscoll, R., Luzwick, J. W., Glick, G. G., Bétous, R., Carroll, C. M., Jung, S. Y., Qin, J., Cimprich, K. A., *et al.* (2013). Atr phosphorylates smarcal1 to prevent replication fork collapse. *Genes & development*, 27(14):1610–1623.
- Croteau, D. L., Popuri, V., Opresko, P. L., und Bohr, V. A. (2014). Human recq helicases in dna repair, recombination, and replication. *Annual Review of Biochemistry*, 83(1).
- Culligan, K., Tissier, A., und Britt, A. (2004). Atr regulates a g2-phase cell-cycle checkpoint in arabidopsis thaliana. *The Plant Cell Online*, 16(5):1091–1104.
- Curtis, M. J., Belcram, K., Bollmann, S. R., Tominey, C. M., Hoffman, P. D., Mercier, R., und Hays, J. B. (2009). Reciprocal chromosome translocation associated with t-dna-insertion mutation in arabidopsis: genetic and cytological analyses of consequences for gametophyte development and for construction of doubly mutant lines. *Planta*, 229(4):731–745.
- 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*, 6(9):1341–1358.

- Cybulski, K. E. und Howlett, N. G. (2011). Fancp/slx4, a swiss army knife of dna interstrand crosslink repair. *Cell Cycle*, 10(11):1757–1763.
- 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. *The Plant Journal*.
- de Groote, F. H., Jansen, J. G., Masuda, Y., Shah, D. M., Kamiya, K., de Wind, N., und Siegal, G. (2011). The rev1 translesion synthesis polymerase has multiple distinct dna binding modes. *DNA repair*, 10(9):915–925.
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G., und Hoeijmakers, J. H. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & development*, 13(7):768–785.
- Deans, A. J. und West, S. C. (2011). Dna interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(7):467–480.
- Dong, Q., Copeland, W., und Wang, T. (1993). Mutational studies of human dna polymerase alpha. identification of residues critical for deoxynucleotide binding and misinsertion fidelity of dna synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32):24163–24174.
- Dorsky, D. und Crumpacker, C. (1990). Site-specific mutagenesis of a highly conserved region of the herpes simplex virus type 1 dna polymerase gene. *Journal of virology*, 64(3):1394–1397.
- Dronkert, M. L. und Kanaar, R. (2001). Repair of dna interstrand cross-links. *Mutation Research/DNA Repair*, 486(4):217–247.
- Elford, H. L. (1968). Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. *Biochemical and biophysical research communications*, 33(1):129–135.
- Enoiu, M., Jiricny, J., und Schärer, O. D. (2012). Repair of cisplatin-induced dna interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis. *Nucleic acids research*, 40(18):8953–8964.
- Esashi, F., Galkin, V. E., Yu, X., Egelman, E. H., und West, S. C. (2007). Stabilization of rad51 nucleoprotein filaments by the c-terminal region of brca2. *Nature structural & molecular biology*, 14(6):468–474.
- Esposito, G., Klein, U., Yaspo, M.-L., Cumano, A., Rajewsky, K., et al. (2000). Disruption of the rev3l encoded catalytic subunit of polymerase  $\zeta$  in mice results in early embryonic lethality. *Current Biology*, 10(19):1221–1224.
- Fairman-Williams, M. E., Guenther, U.-P., und Jankowsky, E. (2010). Sf1 and sf2 helicases: family matters. *Current opinion in structural biology*, 20(3):313–324.
- Falck, J., Coates, J., und Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of atm, atr and dna-pkcs to sites of dna damage. *Nature*, 434(7033):605–611.

- Feng, Z., Scott, S. P., Bussen, W., Sharma, G. G., Guo, G., Pandita, T. K., und Powell, S. N. (2011). Rad52 inactivation is synthetically lethal with brca2 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2):686–691.
- Flaus, A., Martin, D. M., Barton, G. J., und Owen-Hughes, T. (2006). Identification of multiple distinct snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic acids research*, 34(10):2887–2905.
- Flynn, R. L. und Zou, L. (2011). Atr: a master conductor of cellular responses to dna replication stress. *Trends in biochemical sciences*, 36(3):133–140.
- Friesner, J. und Britt, A. B. (2003). Ku80-and dna ligase iv-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in t-dna integration. *The Plant Journal*, 34(4):427–440.
- Gal, S., Pisan, B., Hohn, T., Grimsley, N., und Hohn, B. (1991). Genomic homologous recombination in planta. *The EMBO journal*, 10(6):1571.
- Garcia, V., Bruchet, H., Comesce, D., Granier, F., Bouchez, D., und Tissier, A. (2003). Atatm is essential for meiosis and the somatic response to dna damage in plants. *The Plant Cell Online*, 15(1):119–132.
- Geuting, V., Kobbe, D., Hartung, F., Dürr, J., Focke, M., und Puchta, H. (2009). Two distinct mus81-eme1 complexes from arabidopsis process holliday junctions. *Plant physiology*, 150(2):1062–1071.
- Ghosal, G., Yuan, J., und Chen, J. (2011). The harp domain dictates the annealing helicase activity of harp/smarcal1. *EMBO reports*, 12(6):574–580.
- Gilljam, K. M., Feyzi, E., Aas, P. A., Sousa, M. M., Müller, R., Vågbø, C. B., Catterall, T. C., Liabakk, N. B., Slupphaug, G., Drabløs, F., et al. (2009). Identification of a novel, widespread, and functionally important pcna-binding motif. *The Journal of cell biology*, 186(5):645–654.
- Golub, E. I., Gupta, R. C., Haaf, T., Wold, M. S., und Radding, C. M. (1998). Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded dna binding protein, rpa. *Nucleic acids research*, 26(23):5388–5393.
- Golub, E. I., Kovalenko, O. V., Gupta, R. C., Ward, D. C., und Radding, C. M. (1997). Interaction of human recombination proteins rad51 and rad54. *Nucleic acids research*, 25(20):4106–4110.
- Goodman, M. F. (2002). Error-prone repair dna polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annual review of biochemistry*, 71(1):17–50.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., und Blinov, V. M. (1988). A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in dna and rna replication and recombination. *FEBS letters*, 235(1):16–24.



- Gravel, S., Chapman, J. R., Magill, C., und Jackson, S. P. (2008). Dna helicases sgs1 and blm promote dna double-strand break resection. *Genes & Development*, 22(20):2767–2772.
- Grossmann, K. F., Ward, A. M., Matkovic, M. E., Folias, A. E., und Moses, R. E. (2001). *S. cerevisiae* has three pathways for dna interstrand crosslink repair. *Mutation Research/DNA Repair*, 487(3):73–83.
- Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M. F., Person, M. D., und Paull, T. T. (2010). Atm activation by oxidative stress. *Science*, 330(6003):517–521.
- Haber, J. E. (2000). Partners and pathways: repairing a double-strand break. *Trends in Genetics*, 16(6):259–264.
- Haber, J. E. und Heyer, W.-D. (2001). The fuss about mus81. *Cell*, 107(5):551–554.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., und Maliga, P. (1994). The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 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-strands breaks. *The EMBO journal*, 25(20):4921–4932.
- Haracska, L., Yu, S.-L., Johnson, R. E., Prakash, L., und Prakash, S. (2000). Efficient and accurate replication in the presence of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine by dna polymerase  $\eta$ . *Nature genetics*, 25(4):458–461.
- Harsch, A., Marzilli, L. A., Bunt, R. C., Stubbe, J., und Vouros, P. (2000). Accurate and rapid modeling of iron–bleomycin-induced dna damage using tethered duplex oligonucleotides and electrospray ionization ion trap mass spectrometric analysis. *Nucleic acids research*, 28(9):1978–1985.
- Hartung, F. und Puchta, H. (2006). The recq gene family in plants. *Journal of plant physiology*, 163(3):287–296.
- 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 Research*, 34(16):4438–4448.
- Hartung, F., Suer, S., Knoll, A., Wurz-Wildersinn, R., und Puchta, H. (2008). Topoisomerase 3 $\alpha$  and rmi1 suppress somatic crossovers and are essential for resolution of meiotic recombination intermediates in arabidopsis thaliana. *PLoS genetics*, 4(12):e1000285.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47):18836–18841.

- Hecht, S. M. (1986). The chemistry of activated bleomycin. *Accounts of Chemical Research*, 19(12):383–391.
- Hefferin, M. L. und Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of dna double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA repair*, 4(6):639–648.
- Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J., und Hecht, S. M. (1989). On the mechanism of topoisomerase i inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-dna complex. *Biochemistry*, 28(11):4629–4638.
- Hicks, J. K., Chute, C. L., Paulsen, M. T., Ragland, R. L., Howlett, N. G., Guéranger, Q., Glover, T. W., und Canman, C. E. (2010). Differential roles for dna polymerases eta, zeta, and rev1 in lesion bypass of intrastrand versus interstrand dna cross-links. *Molecular and cellular biology*, 30(5):1217–1230.
- Hirano, Y. und Sugimoto, K. (2006). Atr homolog mec1 controls association of dna polymerase  $\zeta$ -rev1 complex with regions near a double-strand break. *Current biology*, 16(6):586–590.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., und Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1):51–59.
- Ho, T. V. und Schärer, O. D. (2010). Translesion dna synthesis polymerases in dna interstrand crosslink repair. *Environmental and molecular mutagenesis*, 51(6):552–566.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., und Jentsch, S. (2002). Rad6-dependent dna repair is linked to modification of pcna by ubiquitin and sumo. *Nature*, 419(6903):135–141.
- Hoeijmakers, J. H. (2009). Dna damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15):1475–1485.
- Holbeck, S. L. und Strathern, J. N. (1997). A role for rev3 in mutagenesis during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 147(3):1017–1024.
- Hsiang, Y.-H., Hertzberg, R., Hecht, S., und Liu, L. (1985). Camptothecin induces protein-linked dna breaks via mammalian dna topoisomerase i. *Journal of Biological Chemistry*, 260(27):14873–14878.
- Huang, Y., Boynton, R. F., Blount, P. L., Silverstein, R. J., Yin, J., Tong, Y., McDaniel, T. K., Newkirk, C., Resau, J. H., Sridhara, R., *et al.* (1992). Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer research*, 52(23):6525–6530.
- Huang, Y. und Li, L. (2013). Dna crosslinking damage and cancer—a tale of friend and foe. *Translational cancer research*, 2(3):144.
- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M., und Haber, J. E. (2003). Srs2 and sgs1-top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell*, 115(4):401–411.

- Jankowsky, E. und Fairman, M. E. (2007). Rna helicases - one fold for many functions. *Current opinion in structural biology*, 17(3):316–324.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C., Lukas, J., und Jackson, S. P. (2006). Atm-and cell cycle-dependent regulation of atr in response to dna double-strand breaks. *Nature cell biology*, 8(1):37–45.
- Johnson, R. E., Henderson, S. T., Petes, T. D., Prakash, S., Bankmann, M., und Prakash, L. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* rad5-encoded dna repair protein contains dna helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. *Molecular and cellular biology*, 12(9):3807–3818.
- Johnson, R. E., Prakash, L., und Prakash, S. (2012). Pol31 and pol32 subunits of yeast dna polymerase  $\delta$  are also essential subunits of dna polymerase  $\zeta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31):12455–12460.
- Johnson, R. E., Washington, M. T., Haracska, L., Prakash, S., und Prakash, L. (2000). Eukaryotic polymerases  $\iota$  and  $\zeta$  act sequentially to bypass dna lesions. *Nature*, 406(6799):1015–1019.
- Jordan, B. R. (1996). The effects of ultraviolet-b radiation on plants: a molecular perspective. *Advances in botanical research*, 22:98–162.
- Joung, I., Horwitz, M. S., und Engler, J. A. (1991). Mutagenesis of conserved region i in the dna polymerase from human adenovirus serotype 2. *Virology*, 184(1):235–241.
- Joyce, C. M. und Steitz, T. A. (1995). Polymerase structures and function: variations on a theme? *Journal of bacteriology*, 177(22):6321.
- Kane, D. P., Shusterman, M., Rong, Y., und McVey, M. (2012). Competition between replicative and translesion polymerases during homologous recombination repair in drosophila. *PLoS genetics*, 8(4):e1002659.
- Kawamoto, T., Araki, K., Sonoda, E., Yamashita, Y. M., Harada, K., Kikuchi, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Nozaki, K., Hashimoto, N., *et al.* (2005). Dual roles for dna polymerase  $\eta$  in homologous dna recombination and translesion dna synthesis. *Molecular cell*, 20(5):793–799.
- 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):375–384.
- Kim, H. und D'Andrea, A. D. (2012). Regulation of dna cross-link repair by the fanconi anemia/brca pathway. *Genes & development*, 26(13):1393–1408.
- Knizewski, L., Ginalski, K., und Jerzmanowski, A. (2008). Snf2 proteins in plants: gene silencing and beyond. *Trends in plant science*, 13(10):557–565.

- Knoll, A. und Puchta, H. (2011). The role of dna helicases and their interaction partners in genome stability and meiotic recombination in plants. *Journal of experimental botany*, 62(5):1565–1579.
- 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. *The EMBO Journal*, 3(5):1029–1037.
- Koster, D. A., Palle, K., Bot, E. S., Bjornsti, M.-A., und Dekker, N. H. (2007). Antitumour drugs impede dna uncoiling by topoisomerase i. *Nature*, 448(7150):213–217.
- 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):305–309.
- Kunkel, T. A. und Erie, D. A. (2005). Dna mismatch repair\*. *Annu. Rev. Biochem.*, 74:681–710.
- Lee, J. und Paull, T. (2007). Activation and regulation of atm kinase activity in response to dna double-strand breaks. *Oncogene*, 26(56):7741–7748.
- Lee, J.-H. und Paull, T. T. (2005). Atm activation by dna double-strand breaks through the mre11-rad50-nbs1 complex. *Science*, 308(5721):551–554.
- Lee, K.-y. und Myung, K. (2008). Pcn modifications for regulation of post-replication repair pathways. *Molecules and cells*, 26(1):5.
- Lee, Y.-S., Gregory, M. T., und Yang, W. (2014). Human pol  $\zeta$  purified with accessory subunits is active in translesion dna synthesis and complements pol  $\eta$  in cisplatin bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, page 201324001.
- Lehmann, A. R., Niimi, A., Ogi, T., Brown, S., Sabbioneda, S., Wing, J. F., Kannouche, P. L., und Green, C. M. (2007). Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA repair*, 6(7):891–899.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., und Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous dna end-joining. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(9):712–720.
- Lin, W., Xin, H., Zhang, Y., Wu, X., Yuan, F., und Wang, Z. (1999). The human rev1 gene codes for a dna template-dependent dcmp transferase. *Nucleic acids research*, 27(22):4468–4475.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S., und Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (mms) produces heat-labile dna damage but no detectable in vivo dna double-strand breaks. *Nucleic acids research*, 33(12):3799–3811.

- Mailand, N., Gibbs-Seymour, I., und Bekker-Jensen, S. (2013). Regulation of pcna-protein interactions for genome stability. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(5):269–282.
- 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. *The Plant Cell Online*, 22(10):3318–3330.
- Mason, A. C., Rambo, R. P., Greer, B., Pritchett, M., Tainer, J. A., Cortez, D., und Eichman, B. F. (2014). A structure-specific nucleic acid-binding domain conserved among dna repair proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., und Hanaoka, F. (1999). The xpv (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human dna polymerase  $\eta$ . *Nature*, 399(6737):700–704.
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., Hurov, K. E., Luo, J., Bakalarski, C. E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). Atm and atr substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to dna damage. *Science*, 316(5828):1160–1166.
- Mazin, A. V., Bornarth, C. J., Solinger, J. A., Heyer, W.-D., und Kowalczykowski, S. C. (2000). Rad54 protein is targeted to pairing loci by the rad51 nucleoprotein filament. *Molecular cell*, 6(3):583–592.
- McCulloch, S. D., Kokoska, R. J., Chilkova, O., Welch, C. M., Johansson, E., Burgers, P. M., und Kunkel, T. A. (2004). Enzymatic switching for efficient and accurate translesion dna replication. *Nucleic acids research*, 32(15):4665–4675.
- McEachern, M. J. und Haber, J. E. (2006). Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.*, 75:111–135.
- McHugh, P. J., Spanswick, V. J., und Hartley, J. A. (2001). Repair of dna interstrand cross-links: molecular mechanisms and clinical relevance. *The lancet oncology*, 2(8):483–490.
- McIlwraith, M. J., Vaisman, A., Liu, Y., Fanning, E., Woodgate, R., und West, S. C. (2005). Human dna polymerase  $\eta$  promotes dna synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Molecular cell*, 20(5):783–792.
- McIlwraith, M. J. und West, S. C. (2008). Dna repair synthesis facilitates rad52-mediated second-end capture during dsb repair. *Molecular cell*, 29(4):510–516.
- Mimitou, E. P. und Symington, L. S. (2011). Dna end resection - unraveling the tail. *DNA repair*, 10(3):344–348.
- Moldovan, G.-L., Madhavan, M. V., Mirchandani, K. D., McCaffrey, R. M., Vinciguerra, P., und D'Andrea, A. D. (2010). Dna polymerase poln participates in cross-link repair and homologous recombination. *Molecular and cellular biology*, 30(4):1088–1096.

- Moldovan, G.-L., Pfander, B., und Jentsch, S. (2007). PcnA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 129(4):665–679.
- Molinier, J., Ries, G., Bonhoeffer, S., und Hohn, B. (2004). Interchromatid and interhomolog recombination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online*, 16(2):342–352.
- Mortimer, R., Contopoulou, R., und Schild, D. (1981). Mitotic chromosome loss in a radiation-sensitive strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(9):5778–5782.
- Nelson, J. R., Lawrence, C. W., und Hinkle, D. C. (1996). Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase  $\zeta$ . *Science*, 272(5268):1646–1649.
- Nicolette, M. L., Lee, K., Guo, Z., Rani, M., Chow, J. M., Lee, S. E., und Paull, T. T. (2010). Mre11–rad50–xrs2 and sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks. *Nature structural & molecular biology*, 17(12):1478–1485.
- Niedernhofer, L. J., Lalai, A. S., und Hoeijmakers, J. H. (2005). Fanconi anemia (cross) linked to DNA repair. *Cell*, 123(7):1191–1198.
- Niimi, A., Limsirichaikul, S., Yoshida, S., Iwai, S., Masutani, C., Hanaoka, F., Kool, E. T., Nishiyama, Y., und Suzuki, M. (2004). Palm mutants in DNA polymerases  $\alpha$  and  $\eta$  alter DNA replication fidelity and translesion activity. *Molecular and cellular biology*, 24(7):2734–2746.
- Nojima, K., Hochegger, H., Saberi, A., Fukushima, T., Kikuchi, K., Yoshimura, M., Orelli, B. J., Bishop, D. K., Hirano, S., Ohzeki, M., *et al.* (2005). Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells. *Cancer research*, 65(24):11704–11711.
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V. L., Woods, C. G., Jeggo, P. A., und Goodship, J. A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia–telangiectasia and rad3–related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature genetics*, 33(4):497–501.
- Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P. P., Hinkle, D., Kunkel, T. A., Lawrence, C. W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, D., Todo, T., und Woodgate, R. (2001). The  $\gamma$ -family of DNA polymerases. *Molecular Cell*, 8(1):7–8.
- Orel, N., Kyryk, A., und Puchta, H. (2003). Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *The Plant Journal*, 35(5):604–612.
- Patel, P. H. und Loeb, L. A. (2000). DNA polymerase active site is highly mutable: evolutionary consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10):5095–5100.
- Patel, S. S. und Picha, K. M. (2000). Structure and function of hexameric helicases 1. *Annual review of biochemistry*, 69(1):651–697.

- Petermann, E., Orta, M. L., Issaeva, N., Schultz, N., und Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different rad51-mediated pathways for restart and repair. *Molecular cell*, 37(4):492–502.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase i inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6(10):789–802.
- Prakash, S., Johnson, R. E., und Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis dna polymerases: specificity of structure and function. *Annu. Rev. Biochem.*, 74:317–353.
- Prakash, S. und Prakash, L. (2002). Translesion dna synthesis in eukaryotes: a one-or two-polymerase affair. *Genes & development*, 16(15):1872–1883.
- Puchta, H. und Hohn, B. (1996). From centimorgans to base pairs: homologous recombination in plants. *Trends in Plant Science*, 1(10):340–348.
- Ralf, C., Hickson, I. D., und Wu, L. (2006). The bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork. *Journal of biological chemistry*, 281(32):22839–22846.
- Rijkers, T., Van Den Ouweland, J., Morolli, B., Rolink, A. G., Baarends, W. M., Van Sloun, P. P., Lohman, P. H., und Pastink, A. (1998). Targeted inactivation of mouse rad52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Molecular and cellular biology*, 18(11):6423–6429.
- Rosso, M., 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 Molecular Biology*, 53(1-2):247–259.
- Saintigny, Y., Delacôte, F., Varès, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbeck, D., und Lopez, B. S. (2001). Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *The EMBO journal*, 20(14):3861–3870.
- Sakamoto, A., Lan, V. T. T., Hase, Y., Shikazono, N., Matsunaga, T., und Tanaka, A. (2003). Disruption of the *AtREV3* gene causes hypersensitivity to ultraviolet b light and  $\gamma$ -rays in arabidopsis: Implication of the presence of a translesion synthesis mechanism in plants. *The Plant Cell*, 15:2042–2057.
- Sale, J. E., Lehmann, A. R., und Woodgate, R. (2012). Y-family dna polymerases and their role in tolerance of cellular dna damage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(3):141–152.
- Samach, A., Melamed-Bessudo, C., Avivi-Ragolski, N., Pietrokovski, S., und Levy, A. A. (2011). Identification of plant rad52 homologs and characterization of the arabidopsis thaliana rad52-like genes. *The Plant Cell Online*, 23(12):4266–4279.
- Santiago, M. J., Alejandre-Duran, E., und Ruiz-Rubio, M. (2006). Analysis of UV-induced mutation spectra in *Escherichia coli* by DNA polymerase  $\eta$  from *Arabidopsis thaliana*. *Mutation Research*, 601(1-2):51–60.

- Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., und Jackson, S. P. (2007). Human ctip promotes dna end resection. *Nature*, 450(7169):509–514.
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., und Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for brca2 in blocking stalled replication fork degradation by mre11. *Cell*, 145(4):529–542.
- Schneeberger, R. G., Zhang, K., Tatarinova, T., Troukhan, M., Kwok, S. F., Drais, J., Klingger, K., Orejudos, F., Macy, K., Bhakta, A., *et al.* (2005). Agrobacterium t-dna integration in arabidopsis is correlated with dna sequence compositions that occur frequently in gene promoter regions. *Functional & integrative genomics*, 5(4):240–253.
- Sebesta, M., Burkovics, P., Juhasz, S., Zhang, S., Szabo, J. E., Lee, M. Y., Haracska, L., und Krejci, L. (2013). Role of pcna and tls polymerases in d-loop extension during homologous recombination in humans. *DNA repair*, 12(9):691–698.
- Seeberg, E., Eide, L., und Bjørås, M. (1995). The base excision repair pathway. *Trends in biochemical sciences*, 20(10):391–397.
- Sharma, S. und Canman, C. E. (2012). Rev1 and dna polymerase zeta in dna interstrand crosslink repair. *Environmental and molecular mutagenesis*, 53(9):725–740.
- Shiloh, Y. (2001). Atm and atr: networking cellular responses to dna damage. *Current opinion in genetics & development*, 11(1):71–77.
- Shinkai, A., Patel, P. H., und Loeb, L. A. (2001). The conserved active site motif a of escherichia colidna polymerase i is highly mutable. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22):18836–18842.
- Shinohara, A., Ogawa, H., und Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in s. cerevisiae is a reca-like protein. *Cell*, 69(3):457–470.
- Shinohara, A., Shinohara, M., Ohta, T., Matsuda, S., und Ogawa, T. (1998). Rad52 forms ring structures and co-operates with rpa in single-strand dna annealing. *Genes to Cells*, 3(3):145–156.
- Siebler, H. M., Lada, A. G., Baranovskiy, A. G., Tahirov, T. H., und Pavlov, Y. I. (2014). A novel variant of dna polymerase  $\zeta$ , rev3 $\delta$ c, highlights differential regulation of pol32 as a subunit of polymerase  $\delta$  versus  $\zeta$  in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*.
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S., und Wigley, D. B. (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem.*, 76:23–50.
- Sonoda, E., Okada, T., Zhao, G. Y., Tateishi, S., Araki, K., Yamaizumi, M., Yagi, T., Verkaik, N. S., van Gent, D. C., Takata, M., *et al.* (2003). Multiple roles of rev3, the catalytic subunit of pol $\zeta$  in maintaining genome stability in vertebrates. *The EMBO journal*, 22(12):3188–3197.



- Spranger, J., Hinkel, G., Stöss, H., Thoenes, W., Wargowski, D., und Zepp, F. (1991). Schimke immuno-osseous dysplasia: a newly recognized multisystem disease. *The Journal of pediatrics*, 119(1):64–72.
- Steitz, T. A. (1999). Dna polymerases: structural diversity and common mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25):17395–17398.
- Stoddard, B. L. (2005). Homing endonuclease structure and function. *Quarterly reviews of biophysics*, 38(01):49–95.
- Stojic, L., Brun, R., und Jiricny, J. (2004). Mismatch repair and dna damage signalling. *DNA repair*, 3(8):1091–1101.
- Sugimura, K., Takebayashi, S.-i., Taguchi, H., Takeda, S., und Okumura, K. (2008). Parp-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged dna. *The Journal of cell biology*, 183(7):1203–1212.
- Sugiyama, T., Zaitseva, E. M., und Kowalczykowski, S. C. (1997). A single-stranded dna-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* rad51 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 272(12):7940–7945.
- Suhasini, A. N. und Brosh Jr, R. M. (2012). Fanconi anemia and bloom's syndrome crosstalk through fancj-blm helicase interaction. *Trends in Genetics*, 28(1):7–13.
- Sun, H., Treco, D., Schultes, N. P., und Szostak, J. W. (1989). Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. *Nature*.
- Sung, P. (1994). Catalysis of atp-dependent homologous dna pairing and strand exchange by yeast rad51 protein. *Science*, 265(5176):1241–1243.
- Sung, P. (1997). Function of yeast rad52 protein as a mediator between replication protein a and the rad51 recombinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(45):28194–28197.
- Sung, P. und Roberson, D. L. (1995). Dna strand exchange mediated by a rad51-ssdna nucleoprotein filament with polarity opposite to that of reca. *Cell*, 82(3):453–461.
- Symington, L. S. (2002). Role of rad52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(4):630–670.
- 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.
- Takahashi, S., Sakamoto, A., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., und Tanaka, A. (2005). Roles of arabidopsis atrev1 and atrev7 in translesion synthesis. *Plant physiology*, 138(2):870–881.
- Tax, F. E. und Vernon, D. M. (2001). T-dna-associated duplication/translocations in arabidopsis. implications for mutant analysis and functional genomics. *Plant physiology*, 126(4):1527–1538.

- Tay, Y. D. und Wu, L. (2010). Overlapping roles for yen1 and mus81 in cellular holliday junction processing. *Journal of biological chemistry*, 285(15):11427–11432.
- Taylor, A., Harnden, D., Arlett, C., Harcourt, S., Lehmann, A., Stevens, S. u., und Bridges, B. (1975). Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature*.
- Thomä, N. H., Czyzewski, B. K., Alexeev, A. A., Mazin, A. V., Kowalczykowski, S. C., und Pavletich, N. P. (2005). Structure of the swi2/snf2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic rad54. *Nature structural & molecular biology*, 12(4):350–356.
- Toh, G. W.-L., Sugawara, N., Dong, J., Toth, R., Lee, S. E., Haber, J. E., und Rouse, J. (2010). Mec1/tel1-dependent phosphorylation of slx4 stimulates rad1–rad10-dependent cleavage of non-homologous dna tails. *DNA repair*, 9(6):718–726.
- Tomasz, M. (1995). Mitomycin c: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry & biology*, 2(9):575–579.
- Tudek, B. (2007). Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Molecular aspects of medicine*, 28(3):258–275.
- Valdez, B. C., Henning, D., Perumal, K., und Busch, H. (1997). Rna-unwinding and rna-folding activities of rna helicase ii/gu - two activities in separate domains of the same protein. *European Journal of Biochemistry*, 250(3):800–807.
- Vare, D., Groth, P., Carlsson, R., Johansson, F., Erixon, K., und Jenssen, D. (2012). Dna interstrand crosslinks induce a potent replication block followed by formation and repair of double strand breaks in intact mammalian cells. *DNA repair*, 11(12):976–985.
- Wang, S., Wen, R., Shi, X., Lambrecht, A., Wang, H., und Xiao, W. (2011). Rad5a and rev3 function in two alternative pathways of dna-damage tolerance in arabidopsis. *DNA repair*, 10(6):620–628.
- Wang, W. (2007). Emergence of a dna-damage response network consisting of fanconi anaemia and brca proteins. *Nature Reviews Genetics*, 8(10):735–748.
- Warbrick, E. (2000). The puzzle of pcna's many partners. *Bioessays*, 22(11):997–1006.
- West, S. C. (1997). Processing of recombination intermediates by the ruvabc proteins. *Annual review of genetics*, 31(1):213–244.
- Wold, M. S. (1997). Replication protein a: a heterotrimeric, single-stranded dna-binding protein required for eukaryotic dna metabolism. *Annual review of biochemistry*, 66(1):61–92.
- Wong, S., Wahl, A., Yuan, P., Arai, N., Pearson, B., Arai, K.-I., Korn, D., Hunkapiller, M., und Wang, T.-F. (1988). Human dna polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative dna polymerases. *The EMBO journal*, 7(1):37.

- Wood, R. D. (1997). Nucleotide excision repair in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38):23465–23468.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., Micklem, G., *et al.* (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene *brca2*. *Nature*, 378(6559):789–792.
- Wu, Y. (2012). Unwinding and rewinding: double faces of helicase? *Journal of nucleic acids*, 2012.
- Yamagata, K., Kato, J.-i., Shimamoto, A., Goto, M., Furuichi, Y., und Ikeda, H. (1998). Bloom and werner syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast *sgs1* mutant: implication for genomic instability in human diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15):8733–8738.
- Yang, Q., Del Campo, M., Lambowitz, A. M., und Jankowsky, E. (2007). Dead-box proteins unwind duplexes by local strand separation. *Molecular cell*, 28(2):253–263.
- Yang, W. (2003). Damage repair dna polymerases  $\gamma$ . *Current opinion in structural biology*, 13(1):23–30.
- Yoshiyama, K., Conklin, P. A., Huefner, N. D., und Britt, A. B. (2009). Suppressor of gamma response 1 (*sog1*) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to dna damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31):12843–12848.
- Yuan, J., Ghosal, G., und Chen, J. (2009). The annealing helicase harp protects stalled replication forks. *Genes & development*, 23(20):2394–2399.
- Yuan, J., Ghosal, G., und Chen, J. (2012). The harp-like domain-containing protein *ah2/zranb3* binds to *pcna* and participates in cellular response to replication stress. *Molecular cell*, 47(3):410–421.
- Yusufzai, T. und Kadonaga, J. T. (2008). Harp is an atp-driven annealing helicase. *Science*, 322(5902):748–750.
- Yusufzai, T. und Kadonaga, J. T. (2010). Annealing helicase 2 (*ah2*), a dna-rewinding motor with an hnh motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(49):20970–20973.
- Yusufzai, T., Kong, X., Yokomori, K., und Kadonaga, J. T. (2009). The annealing helicase harp is recruited to dna repair sites via an interaction with *rpa*. *Genes & development*, 23(20):2400–2404.
- Zamble, D. B. und Lippard, S. J. (1995). Cisplatin and dna repair in cancer chemotherapy. *Trends in biochemical sciences*, 20(10):435–439.
- Zhang, Y., Yuan, F., Wu, X., und Wang, Z. (2000). Preferential incorporation of g opposite template t by the low-fidelity human dna polymerase  $\epsilon$ . *Molecular and cellular biology*, 20(19):7099–7108.

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):981–994.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Lehrstuhl für Molekularbiologie und Biochemie der Pflanzen (Botanik II) des Karlsruher Instituts für Technologie in der Zeit vom Januar 2011 bis Juni 2014 durchgeführt.

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entstammen, wurden durch Angaben der Quellen kenntlich gemacht.

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

Ort, Datum

Sabrina Kobbe