

Die Reparatur von Topoisomerase 2 *cleavage complexes* in Pflanzen

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte
DISSERTATION

von
M.Sc. Leonie Hacker
aus Karlsruhe

1. Referent: Prof. Dr. Holger Puchta
2. Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2021

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Holger Puchta für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation an seinem Lehrstuhl durchführen zu dürfen. Seine Unterstützung und die zahlreichen interessanten Gespräche und Diskussionen über verschiedene DNA-Reparaturmechanismen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch für die zu Verfügung gestellten Mittel und die Möglichkeit an Konferenzen teilzunehmen möchte ich mich gerne bei ihm bedanken.

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

Ein weiterer großer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Annika Dorn. Sie war über meine gesamte Promotion hinweg stets eine große Unterstützung für mich und trug durch ihre fachlichen Ratschläge und die motivierenden Worte maßgeblich zur Entwicklung dieses Projekts bei. Auch für das sorgfältige Korrekturlesen möchte ich mich gerne bei ihr bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner ehemaligen Betreuerin Dr. Janina Enderle, dafür, dass sie mich in die Welt der Arabidopsen eingeführt hat und mir in meiner Anfangszeit stets mit vielen Ratschlägen und viel guter Laune zur Seite stand.

Auch bei Dr. Manfred Focke würde ich mich gerne für das Korrekturlesen bedanken und für die vielen schönen Grillfeste die wir dank ihm feiern durften.

Ein riesiges Dankeschön geht auch an Theresa Kraus, die durch ihre exzellente technische Hilfe und ihr großes Engagement maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Es war eine große Freude sie einen Großteil ihrer Ausbildung betreuen zu dürfen. Auch bei Carina Jülch und bei Julia Kremer möchte ich mich gerne für ihr großes Engagement im Labor und die technische Hilfe bedanken.

Ein großer Dank geht auch an die Mitarbeiter des botanischen Gartens: Traudel Wehrle, Sabine Wöhle und Karlheinz Knoch, für die sorgfältige Anzucht und Pflege meiner Pflanzen.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern der Botanik II, für das angenehme Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich auch meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen aus Büro 602 für die vielen netten und unterhaltsamen Gespräche danken, welche mir auch abseits der Wissenschaft den Arbeitsalltag versüßt haben.

Ein weiterer großer Dank geht außerdem an meine Familie, meinen Partner Thomas und meine Freunde, dafür, dass sie mich bedingungslos unterstützen und auch in stressigen Phasen für mich da sind.

PUBLIKATIONEN

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Hacker L, Dorn A, Enderle J, Puchta H. 2021. The repair of Topoisomerase 2 cleavage complexes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, koab228

Hacker L, Capdeville N, Feller L, Enderle-Kukla J, Dorn A, Puchta H. 2021. The DNA-dependent Protease AtWSS1A suppresses persistent double strand break formation during replication. *New Phytologist*, PMID: 34761387

Übersichtsartikel:

Hacker L, Dorn A, Puchta H. 2020. Repair of DNA-protein crosslinks in plants. *DNA Repair* 87: 102787.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Kanonische DNA-Reparaturmechanismen.....	2
1.1.1 Direkte enzymatische Photoreaktivierung.....	2
1.1.2 Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur.....	3
1.1.3 Die Basen-Exzisions-Reparatur.....	3
1.1.4 Die <i>Mismatch</i> -Reparatur.....	4
1.1.5 Die replikationsassoziierte Schadenstoleranz.....	4
1.2 Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen.....	5
1.2.1 Die klassische nicht-homologen Endverknüpfung.....	6
1.2.2 Die alternative nicht-homologe Endverknüpfung.....	7
1.2.3 DSB Reparatur durch <i>single strand annealing</i>	9
1.2.4 Die konservative homologe Rekombination.....	10
1.2.5 Der RTR-Komplex.....	13
1.3 Reparatur von DNA-Protein <i>crosslinks</i>	15
1.3.1 Entstehung und Arten von DPCs.....	16
1.3.2 Kanonische DPC Reparaturmechanismen.....	17
1.3.4 DPC Reparatur in Pflanzen.....	19
1.3.5 Die Protease WSS1A.....	20
1.3.6 Die Endonuklease MUS81.....	22
1.3.7 Die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1).....	24
1.3.8 Die Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 2 (TDP2).....	25
1.4 Zielsetzung.....	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Verwendete Organismen.....	28
2.1.2 Verwendete Plasmide.....	29
2.1.3 Verwendete Oligonukleotide.....	29
2.1.4 Enzyme und Enzymmixe.....	30
2.1.5 Kits und Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.6 Chemikalien, Antibiotika und Genotoxine.....	30

2.1.7 Medien, Lösungen und Puffer	31
2.1.8 Geräte	33
2.1.9 Datenbanken und Software.....	35
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	40
2.2.3 Pflanzenspezifische Methoden	41
3. Ergebnisse.....	48
3.1 Etablierung und Analyse von <i>tdp2</i> Mutanten in Arabidopsis.....	48
3.1.1 CRISPR/Cas9 vermittelte Mutagenese von <i>TDP2</i>	48
3.1.2 Charakterisierung von <i>tdp2</i> Mutanten	50
3.2 Analyse von DPC Reparaturfaktoren in der Reparatur von TOP2cc	53
3.3 Eingliederung von TDP2 in das pflanzliche DPC-Reparaturnetzwerk	55
3.3.1 Charakterisierung von <i>tdp1 tdp2</i> Doppelmutanten.....	55
3.3.2 Charakterisierung von <i>tdp2 mus81</i> Doppelmutanten	58
3.3.3 Charakterisierung von <i>tdp2 wss1A</i> Doppelmutanten.....	62
3.4 Reparatur des DSBs nach der Entfernung von TOP2.....	66
3.4.1 Analyse der DSB Reparatur nach TDP2 vermittelter Hydrolyse	66
3.4.2 Analyse der DSB Reparatur nach der Proteolyse von TOP2 durch WSS1A	69
3.5 Untersuchung der Interaktion von WSS1A mit Faktoren des RTR-Komplexes.....	77
4. Diskussion.....	80
4.1 Charakterisierung von <i>tdp2</i> Mutanten	81
4.1.1 CRISPR/Cas vermittelte Mutagenese von <i>TDP2</i>	81
4.1.2 Die Rolle von TDP2 in der somatischen DNA Reparatur.....	82
4.2 Allgemeine Mechanismen der TOP2cc Reparatur	85
4.2.1 Die Entfernung von TOP2.....	85
4.2.2 Die DSB Reparatur nach der Entfernung von TOP2.....	89
4.3 Die Funktion von WSS1A bei der Aufrechterhaltung der Genomstabilität	93
5. Zusammenfassung.....	100
6. Summary	101
7. Literaturverzeichnis	102
8. Anhang.....	121

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Verwendete Mutantenlinien.	28
Tabelle 2.2: Antibiotika und Herbizide.	31
Tabelle 8.1: Primersequenzen zur Genotypisierung.....	122
Tabelle 8.2: Primerkombinationen für Genotypisierungen und Amplifikationen.....	123
Tabelle 8.3: Oligonukleotide für die CRISPR-Klonierung.	123
Tabelle 8.4: Verwendete Primer Kombinationen für die Etablierung von Cas9-generierten <i>tdp2</i> -Mutanten.....	124
Tabelle 8.5: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von <i>tdp2</i> -Mutanten.....	124
Tabelle 8.6: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von <i>tdp2</i> -Mutanten.....	125
Tabelle 8.7: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von DPC Reparaturmutanten.....	126
Tabelle 8.8: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von <i>tdp1 tdp2</i> -Mutanten.	127
Tabelle 8.9: Rohdaten der CPT-Sensitivitätsanalyse von <i>tdp1 tdp2</i> -Mutanten.....	128
Tabelle 8.10: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von <i>tdp1 tdp2</i> Mutanten.....	128
Tabelle 8.11: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von <i>tdp2 mus81</i> -Mutanten.	130
Tabelle 8.12: Rohdaten der CPT-Sensitivitätsanalyse von <i>tdp2 mus81</i> -Mutanten.	131
Tabelle 8.13: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von <i>tdp2 mus81</i> Mutanten.	132
Tabelle 8.14: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von <i>tdp2 wss1A</i> -Mutanten.	133
Tabelle 8.15: Rohdaten der CPT-Sensitivitätsanalyse von <i>tdp2 wss1A</i> -Mutanten.....	134
Tabelle 8.16: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von <i>tdp2 wss1A</i> Mutanten.....	134
Tabelle 8.17: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von <i>tdp2 lig4</i> Mutanten.....	136
Tabelle 8.18: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von <i>tdp2 teb</i> Mutanten.....	137
Tabelle 8.19: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von <i>lig4 wss1A</i> Mutanten.....	138
Tabelle 8.20: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von <i>teb wss1A</i> -Mutanten.....	139
Tabelle 8.21: Rohdaten der Fertilitätsanalyse von <i>teb wss1A</i> -Mutanten.....	140
Tabelle 8.22: Rohdaten der Analyse somatischer Anaphasen.....	141
Tabelle 8.23: Rohdaten der CPT-Sensitivitätsanalyse von <i>teb mus81</i> -Mutanten.....	142
Tabelle 8.24: Rohdaten der Embryonenanalyse von <i>recq4A wss1A</i> -Mutanten.....	143
Tabelle 8.25: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von <i>teb wss1A</i> -Mutanten.....	144
Tabelle 8.26: Rohdaten der Embryonenanalyse von <i>rmi1 wss1A</i> -Mutanten.....	145
Tabelle 8.27: Begrifflichkeiten der zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen.	145
Tabelle 8.28: Begrifflichkeiten der einfaktoriellen ANOVA.	146

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels der nicht-homologen Endverknüpfung....	8
Abbildung 1.2: Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels Mechanismen der homologen Rekombination.....	12
Abbildung 1.3: Reparatur von DNA-Protein <i>crosslinks</i> in Pflanzen.....	19
Abbildung 1.4: Mechanismus der DNA-Protein <i>crosslink</i> Reparatur durch WSS1A.....	21
Abbildung 1.5: Modelle zum Mechanismus der MUS81 vermittelten <i>DNA-Protein crosslink</i> Toleranz.....	23
Abbildung 1.6: Mechanismus der Reparatur von Topoisomerase 1 <i>cleavage complexes</i> durch TDP1.....	25
Abbildung 3.1: Gen- und Domänenstruktur von <i>AtTDP2</i>	49
Abbildung 3.2: cDNA Analyse von <i>tdp2</i> Mutantenlinien.....	50
Abbildung 3.3: Charakterisierung von <i>tdp2</i> -Mutanten.....	51
Abbildung 3.4: Analyse der Etoposid Sensitivität von <i>tdp2</i> Mutanten.....	53
Abbildung 3.5: Etoposid Sensitivitätsanalyse von DPC-Reparaturmutanten.....	54
Abbildung 3.6: Phänotypisierung der <i>tdp2 tdp1</i> Doppelmutante.....	56
Abbildung 3.7: CPT Sensitivitätsanalyse von <i>tdp2 tdp1</i> Doppelmutanten.....	57
Abbildung 3.8: Etoposid Sensitivitätsanalyse der <i>tdp2 tdp1</i> Doppelmutante	58
Abbildung 3.9: Phänotypisierung der <i>tdp2 mus81</i> Doppelmutante.....	60
Abbildung 3.10: CPT Sensitivitätsanalyse der <i>tdp2 mus81</i> Doppelmutante.....	61
Abbildung 3.11: Etoposid Sensitivitätsanalyse der <i>tdp2 mus81</i> Doppelmutante.....	62
Abbildung 3.12: Phänotypisierung der <i>tdp2 wss1A</i> Doppelmutante.....	63
Abbildung 3.13: CPT Sensitivitätsanalyse der <i>tdp2 wss1A</i> Doppelmutante.....	64
Abbildung 3.14: Etoposid Sensitivitätsanalyse der <i>tdp2 wss1A</i> Doppelmutante.....	65
Abbildung 3.15: Etoposid Sensitivitätsanalyse der <i>tdp2 lig4</i> Doppelmutante.....	67
Abbildung 3.16: Etoposid Sensitivitätsanalyse der <i>tdp2 teb</i> Doppelmutante.....	69
Abbildung 3.17: Etoposid Sensitivitätsanalyse der <i>lig4 wss1A</i> Doppelmutante.....	71
Abbildung 3.18: Wuchsphänotyp der <i>teb wss1A</i> Doppelmutante.....	72
Abbildung 3.19: Wurzellänge und Fertilität der <i>teb wss1A</i> Doppelmutante.....	73
Abbildung 3.20: Analyse somatischer Anaphasen von <i>teb wss1A</i> und <i>lig4 wss1A</i>	75
Abbildung 3.21: CPT Sensitivitätsanalyse der <i>teb mus81</i> Doppelmutante.....	77
Abbildung 3.22: Embryonenanalyse der heterozygoten <i>recq4A wss1A</i> Doppelmutante	78
Abbildung 4.1: Modell der TOP2cc Reparatur in Pflanzen	91
Abbildung 4.2: WSS1A beugt der Entstehung von replikativen Doppelstrangbrüchen vor.....	97
Abbildung 8.1: Phänotypisierung der <i>lig4 wss1A</i> Doppelmutante.....	121
Abbildung 8.2: Embryonenanalyse der heterozygoten <i>rmi1 wss1A</i> Doppelmutante.....	122

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aNHEJ	alternatives NHEJ
BER	Basen Exzisions-Reparatur
BIR	<i>Break induced replication</i>
bp	Basenpaar
C-Terminus	Carboxy Terminus
Cas	CRISPR-associated
cNHEJ	<i>classical NHEJ</i>
CO	<i>Crossover</i>
CPT	Camptothecin
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
dHJ	doppelte Holliday <i>junction</i>
D-Loop	<i>displacement-loop</i>
DPC	DNA-Protein <i>crosslink</i>
DSB	Doppelstrangbruch
Eto	Etoposid
G-Phase	<i>Gap Phase</i>
HR	Homologe Rekombination
MMR	<i>Mismatch</i> Reparatur
N-Terminus	Amino Terminus
NCO	<i>Non-crossover</i>
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
PI	Propidiumiodid
rDNA	Ribosomale DNA
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDSA	<i>Synthesis dependent strand annealing</i>
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
S-Phase	Synthese Phase
SSA	<i>Single strand annealing</i>
ssDNA	<i>Single stranded DNA</i>
TLS	Translasionssynthese
TOP1	Topoisomerase 1
TOP2	Topoisomerase 2
TOP1cc	Topoisomerase 1 <i>cleavage complex</i>
TOP2cc	Topoisomerase 2 <i>cleavage complex</i>
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

1. EINLEITUNG

Die DNA ist das grundlegende Fundament allen Lebens, da sie die elementaren Informationen über den Aufbau und die Entwicklung jedes Lebewesens enthält. Es ist daher von essentieller Bedeutung für jedes Lebewesen, die Genomintegrität aufrechtzuerhalten und die DNA vor der Entstehung von Mutationen und vor genomischen Veränderungen zu schützen. Es wirken jedoch ständig zahlreiche verschiedene Faktoren aus der Umwelt, oder aber auch aus zelleigenen Stoffwechselprozessen auf die DNA ein, welche die Genomintegrität gefährden. Pflanzen sind als sessile Organismen besonders betroffen, da sie als phototrophe Organismen einerseits auf Licht angewiesen sind und andererseits permanent der besonders schädlichen ultravioletten Strahlung (UV-Strahlung) ausgesetzt sind. Die UV-Strahlung ist direkt, oder durch die Bildung von freien Radikalen auch indirekt, verantwortlich für eine Vielzahl von DNA-Schäden, wie z.B. abasische Stellen oder geschädigte Basen, aber auch für verheerendere Schäden wie DNA-Doppelstrangbrüche (*double strand breaks*, DSB) und DNA-Quervernetzungen mit DNA oder Proteinen (Britt, 1996; Rastogi *et al.*, 2010). Letztere stellen einen besonders komplexen Schaden dar und werden als Hauptthema dieser Arbeit behandelt. Weiterhin entstehen durch die Photosynthese in Pflanzen reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), welche die DNA endogen in ähnlicher Weise schädigen können. Mutationen die entstanden sind, durch Schäden die nicht rechtzeitig repariert wurden, können in Pflanzen sogar an die nächste Generation weitergegeben werden, da die pflanzliche Keimbahn nicht prädestiniert ist. Um den Verlust von genetischer Information zu vermeiden, verfügen Pflanzen über eine große Auswahl an verschiedenen Reparaturfaktoren, die die Vielzahl an entstehenden Schäden effizient reparieren können. Viele dieser Reparaturmechanismen sind zwischen Pflanzen und anderen eukaryotischen Organismen stark konserviert, weshalb sich Erkenntnisse aus der Forschung der pflanzlichen DNA-Reparatur häufig auf andere höhere Lebewesen, wie Säuger, übertragen lassen. Dabei stellen Pflanzen ein besonders nützliches Modellsystem dar, da der Verlust einzelner Reparaturproteine meist nicht mit so schwerwiegenden Defiziten, wie Embryoletalität, geringer Lebensfähigkeit, oder Sterilität, welche oft bei mammalischen Systemen auftreten, einhergeht. Das ist vor allem auf die pflanzliche Zellwand zurückzuführen, da diese durch ihre Festigkeit die Entwicklung von metastasierenden Tumoren verhindert und so auch die geschädigten Zellen nicht unbedingt auf apoptotische Reaktionen angewiesen sind. Dadurch können Pflanzen als ganze, mehrzellige Organismen mit ausdifferenziertem Gewebe untersucht werden, während Zellkulturen meist das Mittel der Wahl für die Untersuchung der DNA Reparatur in Säugern sind. Durch ihren kurzen Generationszyklus, ihre Fähigkeit zur Selbstbefruchtung und ihr übersichtliches Genom eignet sich die in dieser Arbeit verwendete Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* sehr gut für Untersuchungen zur DNA-Reparatur (Hays, 2002)

1.1 KANONISCHE DNA-REPARATURMECHANISMEN

Als natürlicher Bestandteil des Sonnenlichts, stellt die UV-Strahlung für die meisten Lebewesen einen der größten Risikofaktoren für die Genomintegrität dar, da sie an nahezu allen lebensfreundlichen Orten vorhanden ist. Als erste Schutzbarriere produzieren viele Organismen daher UV-absorbierende Pigmente und lagern diese in ihre Epidermis ein. Dadurch kann zwar bereits ein großer Teil der Strahlung abgeblockt werden, aber ein kleinerer Bestandteil dringt immer noch bis zur DNA durch und kann diese in Folge schädigen (Rastogi *et al.*, 2010). Weitere exogene Risikofaktoren neben der UV-Strahlung können abiotische Faktoren wie Temperatur-, Trockenheits-, oder Salzstress sein, oder aber auch biotische Faktoren wie genotoxische Sekundärmetabolite von Pilzen und Mikroben (Tuteja *et al.*, 2009). Auch hier sind Pflanzen im Besonderen betroffen, da sie aufgrund ihrer Sessilität von Natur aus von ihrer Umgebung und ihrem Substrat abhängig sind. Bei natürlichen Stoffwechselprozessen wie der Demethylierung von Histonen, oder der Photosynthese werden außerdem Nebenprodukte wie reaktive Aldehyde oder ROS freigesetzt, welche endogen Schäden in der DNA verursachen können. Weiterhin kann es sogar auf molekularer Ebene, z.B. bei der Replikation zu Fehlern kommen, die in persistierenden Mutationen resultieren können, wenn sie nicht rechtzeitig behoben werden. Um all diesen Risikofaktoren standhalten zu können und dauerhafte Schäden zu verhindern, verfügen Pflanzen über ein umfangreiches DNA-Reparaturnetzwerk mit dem sie auf die unterschiedlichsten Schäden, spezifisch reagieren können.

1.1.1 Direkte enzymatische Photoreaktivierung

Die häufigste Art von UV-induzierten Schäden stellen Quervernetzungen zwischen zwei benachbarten Pyrimidinbasen dar. Hauptverursacher ist dabei die äußerst energiereiche kurz wellige UV-B-Strahlung (280–315 nm), da diese im Bereich des Absorptionsspektrum der DNA liegt. Dabei entstehen hauptsächlich zwei unterschiedliche Produkte, einerseits die Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und, in etwas geringerer Menge, die 6-4-Photoprodukte (Lippke *et al.*, 1981; Pfeifer, 1997; Rastogi *et al.*, 2010). Bei den Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere sind die C5 und die C6 Kohlenstoffreste der benachbarten Pyrimidinbasen ringförmig miteinander verknüpft, während bei den 6-4-Photoprodukten nur der C6 Kohlenstoffrest der am 5'-Ende lokalisierten Base mit dem C4-Rest der am 3'-Ende lokalisierten Pyrimidinbase verknüpft ist. Beide Arten von Photoprodukten führen zu einer Verzerrung des DNA-Rückgrats und behindern dadurch essentielle Prozesse wie die DNA-Replikation oder die Transkription. Um diesen häufig auftretenden Schaden zügig reparieren zu können verfügen die meisten Organismen, insbesondere Pflanzen, über den Mechanismus der enzymatischen Photoreaktivierung. Substratspezifische Photolyasen vermitteln dabei in einer direkten Reaktion die Spaltung der Dimere. Die Photolyasen sind in der Lage die Verzerrung des DNA-Rückgrats zu erkennen und dadurch an das Pyrimidin-Dimer zu binden. Nach Aktivierung durch Blaulicht, gibt der Co-Faktor FADH⁻ ein Elektron

an das Dimer ab und spaltet dieses damit. Im Anschluss wird das Elektron wieder an den Co-Faktor rückübertragen und das Enzym ist somit regeneriert (Sancar, 1994).

Im Laufe der Evolution sind in der Klasse der höheren Säuger die Photolyase Gene verloren gegangen und sie sind daher auf andere Mechanismen angewiesen um UV-Schäden zu reparieren (Kato *et al.*, 1994). Diese sind auch in Pflanzen von großer Relevanz, da nicht in allen Fällen auf den zwar hocheffizienten, aber auch licht- und substratabhängigen Weg der Photoreaktivierung zurückgegriffen werden kann.

1.1.2 Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur

Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) ist ein weiterer Mechanismus durch welchen Schäden, die das DNA-Rückgrat verzerren, repariert werden können. Neben Photoprodukten können dies aber auch Intrastrang-Quervernetzungen oder andere DNA-Addukte mit Peptiden oder Genotoxinen sein (Marteijn *et al.*, 2014). Die NER kann sowohl während der Transkription als auch genomübergreifend wirken (Gillet & Schärer, 2006; Hanawalt & Spivak, 2008). Dabei unterscheidet sich vor allem die Schadenserkenkung im ersten Schritt. Bei der Transkription wird der Schaden durch die RNA-Polymerase erkannt, wenn diese bei der Transkription auf ein Hindernis auf dem codierenden Strang trifft, während bei der genomübergreifenden NER spezialisierte Proteine die DNA abscannen und daraufhin den Schaden erkennen. Nach der Schadenserkenkung werden weitere Reparaturproteine rekrutiert. Zu diesen gehören Helikasen, Endonukleasen, Polymerasen und auch Ligasen. Die Helikasen trennen den beschädigten vom intakten Strang, und die Endonukleasen entfernen den geschädigten Einzelstrang, indem sie Einzelstrangbrüche 5' und 3' der Läsion induzieren. Die entstandene Lücke, die in der Regel 24-32 Basenpaare (*base pairs*, bp) groß ist, kann im Folgenden durch Polymerasen wieder aufgefüllt und dann durch die Ligasen geschlossen werden (Schärer, 2013; Schröpfer *et al.*, 2014a).

1.1.3 Die Basen-Exzisions-Reparatur

Alkylierende Agenzien, ROS oder spontane hydrolytische Reaktionen verursachen jedoch oft auch nur die Modifikation oder den Verlust einzelner Basen. Diese bewirken zwar keine Konformationsänderung der DNA, aber müssen dennoch rechtzeitig erkannt werden, damit keine bleibenden Mutationen während der Replikation entstehen. Die Basen-Exzision-Reparatur (BER) ist zuständig für die Erkennung und Reparatur solcher modifizierten Basen und abasischen Stellen. Das Schlüsselenzym ist hierbei die DNA-Glykosylase, denn sie erkennt die geschädigte Base und entfernt sie durch Spaltung der N-glykosidischen Bindung aus dem DNA-Grundgerüst. Die resultierende abasische Stelle wird durch spezifische Endonukleasen erkannt und weiter prozessiert, indem diese das noch intakte Zucker-Phosphat-Rückgrat an der betreffenden Stelle schneiden. Der Desoxyribose-Phosphatrest wird durch Endonukleasen oder Lyasen entfernt und die entstandene Lücke kann durch Polymerasen wieder

aufgefüllt und durch Ligasen versiegelt werden. Dabei wird zwischen der *short-patch*-BER, bei welcher nur ein Nukleotid aufgefüllt wird, und der *long-patch*-BER, bei welcher ein 2-13 bp langer Strang neu synthetisiert wird, unterschieden (Krokan & Bjørås, 2013; Roldán-Arjona *et al.*, 2019). In Säugern sind bei der *short-patch*-BER die Enzyme Pol β und Lig III beteiligt (Kubota *et al.*, 1996). Für beide Enzyme existieren jedoch keine Homologe in Pflanzen, weshalb der genaue Mechanismus der *short-patch*-BER in Pflanzen noch weitestgehend unbekannt ist (Uchiyama *et al.*, 2004; Kimura & Sakaguchi, 2006). Bei der *long-patch*-BER dagegen sind andere Polymerasen beteiligt, von welchen auch Orthologe in Pflanzen aufzufinden sind (Uchiyama *et al.*, 2002; Roldán-Arjona *et al.*, 2019).

1.1.4 Die *Mismatch*-Reparatur

Auch bei der Replikation kann es trotz der Korrekturlesefunktion der replikativen Polymerase zu Schäden kommen, da in einem von 10^8 Fällen eine falsche Base eingebaut wird (Kunkel, 2004). Wenn diese Fehlpaarungen nicht behoben werden, können sie nach der nächsten Replikationsrunde in persistierenden Mutationen resultieren. Durch den *Mismatch*-Reparatur Weg (MMR) können postreplikativ 99 % dieser fehlgepaarten Basen erkannt und repariert werden (Tago *et al.*, 2005). Der Mechanismus der MMR ist hochkonserviert und somit in allen Bereichen des Lebens zu finden. Abgesehen von ein paar Details sind dabei die grundlegenden Schritte bei Prokaryoten und Eukaryoten die gleichen. Im ersten Schritt der MMR erkennen spezifische Proteine die fehlgepaarten Basen, durch die Verzerrung im DNA-Rückgrat. Im zweiten Schritt schneiden Endonukleasen im neu synthetisierten Tochterstrang der DNA, damit das DNA Stück mit dem falsch eingebauten Nukleotid durch Exonukleasen wieder entfernt werden kann. In diesem Schritt ist es essentiell, dass der Tochterstrang effizient vom Elternstrang unterschieden wird. In Bakterien ist der Elternstrang vom Tochterstrang differenzierbar, da dieser im Vergleich zum neu synthetisierten Tochterstrang methyliert ist (Welsh *et al.*, 1987). In Eukaryoten gestaltet sich die Differenzierung weniger leicht, es wird jedoch vermutet, dass der Tochterstrang anhand der asymmetrischen Struktur der Replikations-ausgerichteten Ringklemme (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*, PCNA), oder durch die vermehrte Präsenz von Einzelstrangbrüchen nach der Replikation, wie sie z.B. bei Okazaki-Fragmenten üblich sind, identifiziert werden kann (Constantin *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2017). Nach erfolgreicher Entfernung des DNA-Stücks mit dem fehlgepaarten Nukleotid, kann die entstandene Lücke durch Polymerasen wieder neu aufgefüllt und mittels einer Ligase verschlossen werden (Jiricny, 2006; Schröpfer *et al.*, 2014a).

1.1.5 Die replikationsassoziierte Schadenstoleranz

Wenn die DNA in proliferierenden Zellen geschädigt wird, oder wenn Schäden nicht rechtzeitig vor dem Eintritt in die replikative Phase eliminiert werden, kann dies schwerwiegenden Folgen haben. Die Replikationsmaschinerie kann defekte DNA nicht als Matrize für die Neusynthese nutzen, daher wird

sie an der geschädigten Stelle angehalten. Um den Zusammenbruch der Replikationsgabel zu verhindern, welcher weiterhin zu chromosomalen Umordnungen bis hin zum Zelltod führen kann, haben sich zwei verschiedene Mechanismen zur Schadenstoleranz von replikativen Schäden entwickelt (Budzowska & Kanaar, 2009). Die Transläsionssynthese (TLS) ist ein Mechanismus, bei dem Schäden während der Replikation umgangen werden können. Dabei wird die replikative Polymerase an der Schadstelle durch eine Transläsionspolymerase abgelöst (Hicks *et al.*, 2010). Diese besitzt ein modifiziertes reaktives Zentrum mit welchem sie den defekten DNA-Strang aufnehmen und mit neuen Nukleotiden paaren kann. Die TLS hat allerdings häufig die Entstehung von Punktmutationen zur Folge, da die Transläsionspolymerase die Basen an der Schadstelle nicht richtig erkennen kann und daher oftmals falsche Nukleotide einbaut (Sale, 2013). Nachdem die Schadstelle erfolgreich passiert wurde, wird die Transläsionspolymerase zur Fortsetzung der Replikation wieder durch die replikative Polymerase ersetzt.

Der Matrizenwechsel (*template switch*) ist ein weiterer Mechanismus zur Umgehung von Schäden während der Replikation, welcher aber im Gegensatz zur TLS fehlerfrei ist. Bei diesem wird die Replikation am beschädigten Strang einseitig angehalten, während die Replikation am unbeschädigten Strang in einer *overshoot* Synthese fortgesetzt wird. Der neu synthetisierte Tochterstrang kann danach durch die Regression der Replikationsgabel, bei welcher eine *chicken foot structure* ausgebildet wird, wieder als Matrize anstelle des geschädigten Strangs genutzt werden. Nach erfolgreicher Kopie der korrekten genetischen Information über die Schadstelle hinweg, kann die Struktur aufgelöst und die Replikation normal fortgesetzt werden (Blastyák *et al.*, 2007; Atkinson & McGlynn, 2009). Die Wahl welcher Schadenstoleranzmechanismus während der Replikation genutzt wird, hängt vom Ubiquitinierungsgrad der PCNA ab. Ist diese monoubiquitiniert, wird die TLS eingeleitet (Stelter & Ulrich, 2003). Wenn sie aber polyubiquitiniert ist, wird der Matrizenwechsel eingeleitet (Hoegge *et al.*, 2002). Mit der TLS und dem *template switch* Mechanismus können vor allem beschädigte Nukleotide, oder sperrige Hindernisse umgangen werden. Kann die Replikationsgabel nach der Regression nicht wiederhergestellt werden, oder trifft die Replikationsgabel auf einen Einzelstrangbruch, entwickelt sich daraus ein einseitiger Doppelstrangbruch, der einen weitaus komplizierteren Schaden darstellt und weiterer Reparaturmechanismen bedarf.

1.2 DIE REPARATUR VON DOPPELSTRANGBRÜCHEN

Durch eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren, entstehen im Laufe eines Tages etwa zehn Doppelstrangbrüche (DSBs) pro Zelle (Martin *et al.*, 1985). Exogen können sie direkt durch ionisierende Strahlung, ROS oder durch verschiedene DSB induzierende Chemikalien erzeugt werden. Weiterhin können sie endogen als Nebenprodukt bei der Reparatur von DNA-Schäden, bei der Transkription, oder durch das Aufeinandertreffen von Replikationsgabel und Einzelstrangbruch entstehen (Cannan & Pederson, 2016). Da bei diesem Schaden beide DNA-Stränge betroffen sind und somit keine direkte

Matrize für die Reparatur mehr verfügbar ist, besteht die Gefahr, des Informationsverlusts in Form von Insertionen und Deletionen, bis hin zum Verlust oder zu Fusionen von ganzen Chromosomenfragmenten, falls der DSB nicht rechtzeitig erkannt und repariert wird (Britt, 1996; Waterworth *et al.*, 2011). Um dieser Gefahr entgegenzuwirken verfügen alle Lebewesen über verschiedene DSB Reparaturwege. Diese können grob in die nicht-Homologie vermittelten nicht-homologen Endverknüpfungs- (*non-homologous end joining*, NHEJ) und die Homologie vermittelten Mechanismen der homologen Rekombination (HR) unterteilt werden. Die NHEJ Mechanismen gehen dabei mit einer erhöhten Fehlerrate einher, da die Bruchenden dabei, ohne Wiederherstellung eines etwaigen Sequenzverlusts, einfach wieder verknüpft werden. Hierbei wird nochmals zwischen der klassischen NHEJ (*classical NHEJ*, cNHEJ), bei der die Enden direkt verknüpft werden, und der alternativen NHEJ (aNHEJ), bei welcher kurze homologe Sequenzen zur Annäherung der Bruchenden genutzt werden, unterschieden (Chang *et al.*, 2017). Bei den HR vermittelten DSB Reparatur Mechanismen werden im Gegenzug dazu, längere homologe Bereiche verwendet. Die HR kann weiter unterteilt werden in den nicht-konservativen Weg des *single strand annealings* (SSA), sowie in die konservativen Mechanismen des *swynthesis dependent strand annealings* (SDSA) und der erweiterten HR, bei der eine doppelte *Holliday junction* (dHJ) ausgebildet wird. Bei den konservativen Mechanismen des SDSA und der HR wird jeweils ein homologes Donor Molekül, wie beispielsweise das Schwesterchromatid, als Matrize für die Wiederherstellung der DNA Sequenz genutzt (Li & Heyer, 2008). Die Wahl mit welchem Mechanismus der vorliegende DSB repariert wird, wird abhängig von der Zellzyklusphase und von der Struktur des DSB getroffen (Scully *et al.*, 2019). Da in der G1-Phase kein Schwesterchromatid vorhanden ist, werden fast alle DSB die in dieser Phase entstehen über NHEJ repariert (Beucher *et al.*, 2009). Die Prozesse der verschiedenen DSB Reparaturmechanismen sind zum Verständnis dieser Arbeit essentiell und werden daher im Folgenden genauer erklärt.

1.2.1 Die klassische nicht-homologe Endverknüpfung

Der Mechanismus der klassischen nicht-homologen Endverknüpfung (cNHEJ) ist von Prokaryoten bis hin zu den Metazoen stark konserviert und kann eine Vielzahl unterschiedlicher DSB wieder verknüpfen (Chang *et al.*, 2017). Der Mechanismus beruht im Wesentlichen auf dem Schutz der DSB Enden vor dem Abbau durch Nukleasen und der anschließenden Ligation. Das KU70/KU80 Heterodimer erkennt dabei den DSB und bindet an beide Enden des Bruchs um sie vor dem Abbau durch Exonukleasen zu schützen. Für die erfolgreiche Protektion sollten die Bruchenden nur relativ kurze DNA Überhänge, aufweisen, da das KU-Heterodimer sonst weniger gut binden kann (Dyan & Yoo, 1998; Chang *et al.*, 2017). Anschließend rekrutiert das KU-Heterodimer weitere NHEJ Faktoren um den Bruch zu schließen. Handelt es sich um einen DSB mit glatten Enden, kann dieser direkt durch den XRCC4/LIG4 Komplex geschlossen werden (siehe Abbildung 1.1 A). Sind die Bruchenden jedoch inkompatibel, da die betroffenen Strangenden unterschiedliche Überhänge haben, müssen diese zunächst prozessiert

werden. In Säugern wird dies gewährleistet durch die Rekrutierung der DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) und der Endonuklease Artemis. Die DNA-PKcs wird durch die Bindung an die DNA autophosphoryliert, wodurch sie in Folge die Endonukleaseaktivität von Artemis aktiviert. Diese schneidet anschließend die Enden so zurecht, dass sie mittels des XRCC4/LIG4 Komplexes ligiert werden können (Goodarzi *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2010). Bei zwei inkompatiblen 3'-Enden können weiterhin durch die Polymerase Pol μ neue Nukleotide hinzugefügt werden, damit Mikrohomologien zur Paarung der Basen entstehen und der Bruch anschließend ligiert werden kann (Nick McElhinny & Ramsden, 2003; Gu *et al.*, 2007). Tritt der Fall auf, dass die DSB Überhänge zwar kompatibel sind, aber einige wenige Nukleotide fehlen, können diese Lücken durch die Polymerase Pol λ aufgefüllt werden und anschließend mittels des XRCC4/LIG4 Komplexes ligiert werden (Nick McElhinny *et al.*, 2005; Pryor *et al.*, 2015). Das Resultat der DSB Reparatur durch cNHEJ ist in vielen Fällen die korrekte Reparatur des Bruchs, doch in einigen Fällen kommt es auch zu kleiner Insertionen, Deletionen oder sogenannten InDels, die eine Kombination dieser darstellen (Salomon & Puchta, 1998; Geisinger *et al.*, 2016; Schmidt *et al.*, 2019; Beying *et al.*, 2020). In Pflanzen ist der cNHEJ Mechanismus weit weniger gut erforscht als in Säugern und es konnten bisher nur Homologe für das KU70/KU80 Heterodimer, für den XRCC4/LIG4 Komplex und in Reis auch ein Homolog für Pol λ gefunden werden (Uchiyama *et al.*, 2004; Lieber, 2010). Homologe für die DNA-PKcs und Artemis konnten dagegen bisher noch nicht identifiziert werden (Waterworth *et al.*, 2011). Erstaunlicherweise sind Pflanzen, die eine *loss-of-function* Mutation in essentiellen Genen des cNHEJ Wegs haben, im Gegensatz zu Säugern nicht embryolethal und weisen sogar einen weitgehend normalen Phänotyp auf (West *et al.*, 2004; Fulcher & Sablowski, 2009).

1.2.2 Die alternative nicht-homologe Endverknüpfung

Der Mechanismus der alternativen nicht-homologen Endverknüpfung (aNHEJ) ist auch bekannt unter Namen *microhomology mediated end joining* (MMEJ), oder *POLQ-mediated end joining* und dient als Alternative für den cNHEJ Mechanismus in der DSB Reparatur. Die Wahl, wie der vorliegende DSB repariert wird, fällt auf den aNHEJ Weg, wenn die Enden des DSB etwas stärker resektiert sind, da das KU70/KU80 Heterodimer eine geringere Affinität zu längeren einzelsträngigen DNA Sequenzen (*single stranded DNA*, ssDNA) (> 30 bp) besitzt und diese somit nicht mehr so effizient binden kann um den cNHEJ Weg einzuleiten (Mimori & Hardin, 1986). Da das KU70/KU80-Heterodimer in jeder Zelle in großen Mengen vorhanden ist, ist die Wahrscheinlichkeit, dass KU die freien Enden des DSBs vor anderen Faktoren bindet, normalerweise sehr groß (Chang *et al.*, 2017). Allerdings sinkt diese Wahrscheinlichkeit in der S- und der G2-Phase des Zellzyklus, da dann Faktoren aktiver sind, die die Resektion von freien DNA Enden verursachen (Escribano-Díaz *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2017). Der Mechanismus des aNHEJs beruht darauf, dass durch die verstärkte DNA-Resektion Mikrohomologien

in den 3'-Überhängen freigelegt werden, die sich anschließend paaren können. Dadurch wird der DSB stabilisiert und kann im Folgenden wieder geschlossen werden (siehe Abbildung 1.1 B).

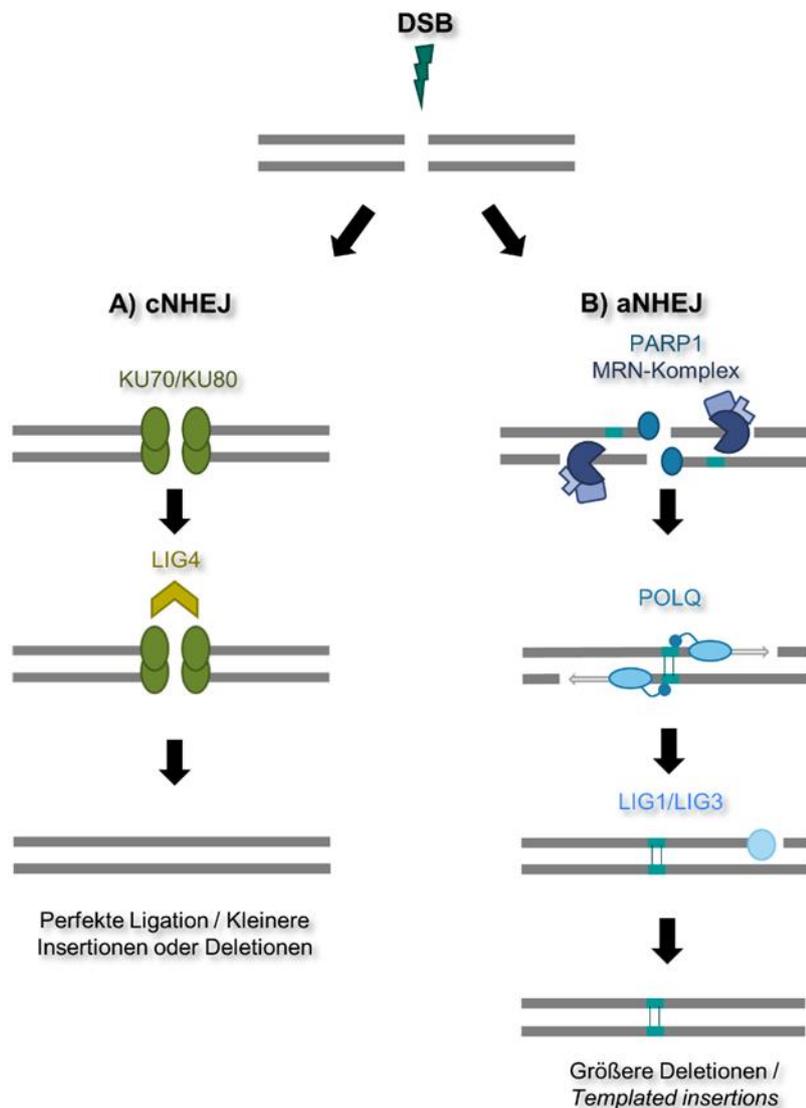


Abbildung 1.1: Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels der nicht-homologen Endverknüpfung

Bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) mittels des *non-homologous end joining* (NHEJ) existieren zwei unterschiedliche Mechanismen. **A)** Im klassischen NHEJ (cNHEJ) bindet das KU70/KU80-Heterodimer an die freien Enden des DSBs und schützt diese vor dem Abbau durch Nukleasen. Handelt es sich dabei um einen DSB mit glatten Enden, kann dieser im Folgenden direkt durch die Ligase LIG4 wieder geschlossen werden. Das Resultat des cNHEJ-Wegs ist oft eine perfekte Ligation, aber es können auch kleine Insertionen oder Deletionen eingeführt werden. **B)** Im alternativen NHEJ (aNHEJ) dagegen, wird der DSB durch das Signalprotein PARP1 erkannt, welches im Folgenden den MRN-Komplex, bestehend aus der Endonuklease MRE11, der Rekombinase RAD50 und dem Strukturprotein NBS1, rekrutiert. Der MRN-Komplex resektiert die 5'-Enden des DSB, wodurch kurze homologe Bereiche in den 3'-Überhängen freigelegt werden. Die Polymerase POLQ, das Schlüsselenzym des aNHEJ Wegs, vermittelt die Aneinanderlagerung der Mikrohomologien mittels ihrer Helikase-Domäne. Nach der Entfernung der heterologen 3'-Überhänge, werden die Lücken abseits der Mikrohomologien mittels der Polymeraseaktivität von POLQ wieder aufgefüllt und abschließend durch die Ligasen LIG1 oder LIG3 versiegelt. Die DSB-Reparatur durch aNHEJ ist sehr fehlerbehaftet und geht mit der Entstehung von größeren Deletionen und *templated insertions* einher.

Der aNHEJ Mechanismus wird eingeleitet durch die Erkennung des DSB durch die Poly (ADP-ribo) Polymerase 1 (PARP1) welche im Folgenden die Endonuklease CtIP und den MRN-Komplex, bestehend aus der Endo-/Exonuklease MRE11, der Rekombinase RAD50 und dem Strukturprotein NBS1, rekrutiert (Robert *et al.*, 2009). Der MRN-Komplex initiiert die sogenannte *short range* Resektion, indem er das 5'-Ende des Bruchs mit seiner Endonukleaseaktivität bis zu 300 bp abseits des DSB schneidet und die DNA daraufhin mittels seiner 3' – 5' Exonuklease Aktivität zusammen mit CtIP resektiert (Garcia *et al.*, 2011). Durch die Resektion der 5'-Enden werden in den 3'-Überhängen Mikrohomologien freigelegt die sich im Folgenden mithilfe der Helikasefunktion von POLQ aneinanderlagern können. Dabei reichen bereits Mikrohomologien in der Größe von 2 -20 bp aus um eine erfolgreiche Paarung zu gewährleisten (Wyatt *et al.*, 2016). Die heterologen 3'-Überhänge abseits der Mikrohomologien, werden durch Nukleasen entfernt und die entstandene Lücke wird mittels der Polymeraseaktivität von POLQ wieder neu gefüllt (Chang *et al.*, 2017). Abschließend wird die Lücke im Phosphatrückgrat durch die Ligasen LIG1 und LIG3 versiegelt (Masani *et al.*, 2016). Der Mechanismus des aNHEJ gilt allgemein als sehr fehlerbehaftet, da durch die Reparatur größere Deletionen und sogenannte *templated insertions* entstehen (Yu & McVey, 2010; Qi *et al.*, 2013). Pflanzen verfügen über Homologe für den MRN- Komplex, PARP1, LIG1 und POLQ, für welche auch bereits größtenteils eine Funktion im pflanzlichen aNHEJ Weg nachgewiesen werden konnte (Babychuk *et al.*, 1998; Inagaki *et al.*, 2006; Waterworth *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2013). Das pflanzliche Homolog von POLQ weist dabei auch die charakteristische N-terminale Helikase Domäne, neben der C-terminalen Polymerase Domäne auf. Arabidopsis Mutanten, die eine *loss-of-function* Mutation im Gen für POLQ aufweisen, wurden *tebichi* genannt, da die Blattmorphologie einem Schweinhuf ähnelt. Durch Untersuchung der Mutanten konnten AtPOLQ Funktionen in der Regulation der Genexpression, der Transkription, der Replikation und der DNA-Reparatur zugewiesen werden (Inagaki *et al.*, 2006; Klemm *et al.*, 2017). Weiterhin sind *teb* Mutanten nicht mittels der üblichen *Floral Dip* Methode transformierbar, da AtPOLQ essentiell für den Einbau der T-DNA in die genomische DNA ist (van Kregten *et al.*, 2016).

1.2.3 DSB Reparatur durch *single strand annealing*

Der *single strand annealing* (SSA) Mechanismus stellt einen wichtigen DSB Reparatur Mechanismus dar, wenn die Enden des DSB bereits stark resektiert wurden und es auf beiden Seiten des DSB größere Sequenzhomologien (> 100 bp) gibt (Kelso *et al.*, 2017). Der Mechanismus wird ähnlich wie beim aNHEJ durch Resektion der 5'-Enden des DSB initiiert. Durch die starke Resektion werden auf beiden Seiten des DSB homologe Regionen in den 3'-Überhängen freigelegt, die sich mithilfe der Rekombinase RAD52 aneinanderlagern können. Anschließend werden die ungepaarten 3'-Überhänge von Nukleasen entfernt und der Bruch durch Ligasen geschlossen (Samach *et al.*, 2011; Kelso *et al.*, 2017). Da bei diesem Vorgang der Bereich zwischen den homologen Bereichen, sowie eine Sequenzhomologie

entfernt werden, ist dieser Mechanismus unweigerlich mit der Entstehung größerer Deletionen verbunden (siehe Abbildung 2). Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass in Pflanzen ein Drittel aller DSBs mit Sequenzhomologien durch diesen Mechanismus repariert werden (Puchta, 2005). Der SSA Mechanismus könnte jedoch einen Vorteil bei der Reparatur von DSB an blockierten Replikationsgabeln bringen, da dort sonst, durch häufige Versuche von SDSA (siehe Abschnitt 1.2.4), *tandem duplications* entstehen können (Scully *et al.*, 2019).

1.2.4 Die konservative homologe Rekombination

Die homologe Rekombination (HR) stellt einen konservativen Mechanismus zu Reparatur von DSB dar, da die genetische Information durch Einwanderung in ein homologes Donormolekül wieder neu synthetisiert werden kann (siehe Abbildung 1.2). Das Donormolekül ist in den meisten Fällen ein Schwesterchromatid, weshalb die HR vor allem auf die S- und G2-Phase des Zellzyklus begrenzt ist (Kadyk & Hartwell, 1992; Takata *et al.*, 1998). Neben dem Schwesterchromatid können aber auch andere homologe Sequenzen, wie das homologe Chromosom, oder intrachromosomale homologe Sequenzen als Donormoleküle genutzt werden (Puchta, 2005). Während die HR eine eher untergeordnete Rolle in der somatischen DNA Reparatur mehrzelliger Lebewesen spielt, ist sie in der Meiose für die Neukombination des Genmaterials zwischen den homologen Chromosomen unerlässlich (Puchta, 2005; Osman *et al.*, 2011; Mercier *et al.*, 2015). Die konservative HR wird, wie der SSA und der aNHEJ Mechanismus, eingeleitet durch die MRN-Komplex vermittelte Resektion der 5'-Enden (Symington & Gautier, 2011). Da es für die HR einer exzessiveren Resektion bedarf, werden die nun etwa 300 bp langen 3' ssDNA Überhänge weiter verlängert, indem weitere Exonukleasen die 5'-Enden noch stärker resektieren (Mimitou & Symington, 2008; Daley *et al.*, 2017). Zum Schutz der resultierenden langen 3'-Überhänge vor dem Abbau durch Nukleasen, werden sie zunächst von dem Einzelstrangbindeprotein RPA ummantelt (San Filippo *et al.*, 2008). Um die DSB Reparatur Richtung HR zu kanalisieren, muss RPA durch die Rekombinase RAD51 ersetzt werden, da sonst andere DSB Reparatur Wege, wie SSA oder aNHEJ eingeschlagen werden können (Chang *et al.*, 2017). Die Signalgebung für diesen Prozess wird in Vertebraten und Pflanzen durch das Protein BRCA2 und in Hefe durch RAD52 übernommen (Sugawara *et al.*, 2003; San Filippo *et al.*, 2008; Seeliger *et al.*, 2012). Die Rekombinase RAD51 kann im Folgenden mit der DNA ein sogenanntes Nukleoproteinfilament bilden, welches dann in die homologe DNA Matrize einwandern kann. RAD51 vermittelt dabei die Suche nach Homologien und vereinfacht die Basenpaarung der homologen Sequenzen (Stark *et al.*, 2004; San Filippo *et al.*, 2008). Ist die richtige homologe Stelle gefunden, kann der Strang durch Neusynthese anhand der homologen Matrize unter Verdrängung des komplementären Stranges, verlängert werden. Die daraus resultierende DNA-Struktur wird *displacement loop* (D-Loop) genannt. Im *synthesis dependent strand annealing* (SDSA) Weg, welcher der vorherrschende konservative HR Mechanismus der somatischen DSB-Reparatur in Pflanzenzellen ist, wird der D-Loop nach

ausreichender Neusynthese durch Helikasen und Endonukleasen aufgelöst und der verlängerte Strang kann sich wieder mit den homologen Bereichen des 3'-Überhangs des gegenüberliegenden Bruchendes paaren (Nassif *et al.*, 1994; Barber *et al.*, 2008; Vindigni & Hickson, 2009; Pepe & West, 2014). Die Lücken abseits der gepaarten Bereiche können durch Polymerasen aufgefüllt und durch Ligasen wieder geschlossen werden. Der SDSA Weg gilt bei Nutzung des Schwesterchromatids als Matrize als fehlerfrei, da die genetischen Informationen lediglich kopiert werden, wodurch kein genetischer Austausch stattfindet und somit nur *non-crossover* Produkte (NCO) entstehen (Puchta, 1998).

Alternativ zum SDSA Weg, kann der D-Loop durch extensive DNA-Synthese so stark vergrößert werden, dass er komplementär zum 3'-Überhang des zweiten Bruchendes ist und in einem *second-end capture* Mechanismus von dem gegenüberliegenden Bruchende gebunden werden kann (siehe Abbildung 1.2). Das daraus entstehende Rekombinationsintermediat mit zwei gegenüberliegenden Kreuzungspunkten wird doppelte Holliday Junction (dHJ) genannt und kann durch zwei verschiedene Mechanismen aufgelöst werden (Holliday, 1964). Ein Weg zur Auflösung der dHJ wird durch das Doppelstrangbruch Reparatur Modell beschrieben (Szostak *et al.*, 1983). Bei diesem Mechanismus schneiden Endonukleasen, sogenannte Resolvasen, die dHJ symmetrisch an den Knotenpunkten. Je nach Orientierung der Schnitte können allerdings unterschiedliche Produkte entstehen. Neben den NCO Produkten entstehen dementsprechend *crossover* (CO) Produkte, bei denen ein reziproker Austausch von Chromosomenarmen stattgefunden hat. Ein zu hohes Auftreten von CO-Ereignissen ist bei der somatischen DNA Reparatur aber unerwünscht, da diese in der Entstehung von dizentrischen und azentrischen Chromosomen resultieren können und somit zur genetischer Instabilität führen (Knoll *et al.*, 2014a). Die Dissolution der dHJ stellt einen alternative Weg zur Auflösung der dHJ dar, bei welchem jedoch ausschließlich NCO-Produkte gebildet werden. Die Dissolution, wird durch den konservierten RTR-Komplex, bestehend aus einer Helikase, einer Topoisomerase des Typs 1A und einem Strukturprotein vermittelt. Die Helikase schiebt mit ihrer *branch migration* Aktivität die Knotenpunkte der dHJ aufeinander zu, wodurch ein Hemikatenan gebildet wird. Dieses kann im Folgenden mittels der Topoisomerase TOP3 α geschnitten und aufgelöst werden (Wu & Hickson, 2003). In Pflanzen und anderen mehrzelligen Organismen, stellt die HR jedoch im Gegensatz zum NHEJ einen eher untergeordneten DSB-Reparaturmechanismus dar (Puchta, 2005; Zhao *et al.*, 2020). Die Ursache hierfür könnte sein, dass die fehlerfreie Reparatur durch HR für mehrzellige Lebewesen nicht essentiell lebensnotwendig ist und sie durch die Suche nach Homologien einen eher langsamen Reparaturweg darstellt (Chang *et al.*, 2017).

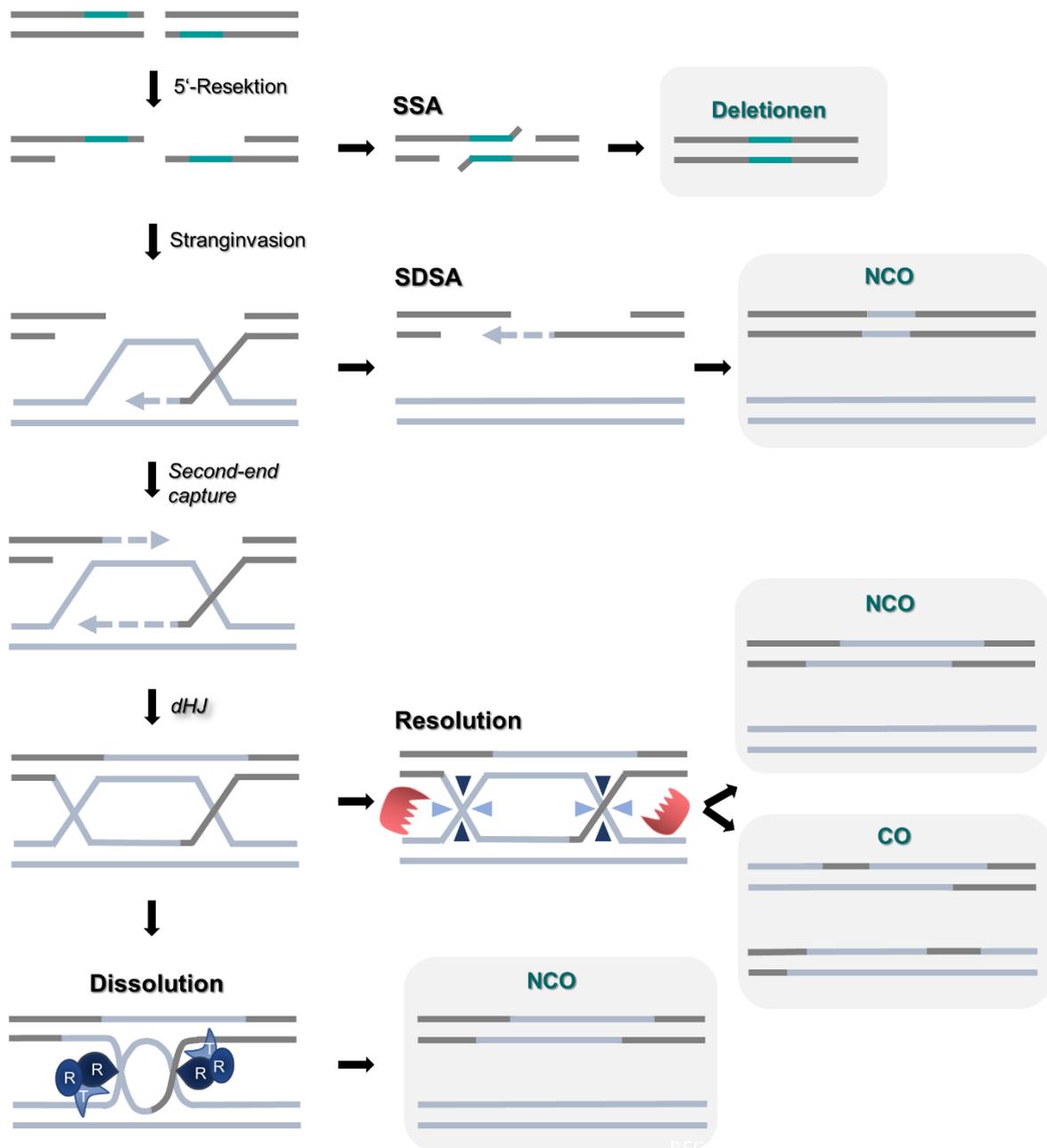


Abbildung 1.2: Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels Mechanismen der homologen Rekombination.

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) durch die homologe Rekombination (HR), wird eingeleitet durch eine verstärkte Resektion der 5'-Enden. Befinden sich auf beiden Seiten des DSB homologe Bereiche, können diese sich im *single strand annealing* (SSA) Weg aneinander anlagern und die Lücken im Folgenden geschlossen werden. Dieser Weg ist zwangsläufig mit einem Informationsverlust verbunden. Befinden sich keine Sequenzhomologien auf beiden Seiten des DSB, kann der beschädigte Strang in ein intaktes Donormolekül einwandern und dieses, unter Verdrängung des komplementären Stranges, als Matrize zur Neusynthese der Information nutzen. Für die weitere Prozessierung gibt es zwei Möglichkeiten. Im *synthesis dependent strand annealing* (SDSA) wird der durch die Neusynthese entstehende *displacement Loop* (D-Loop) durch Helikasen und Nukleasen wieder aufgelöst, der verlängerte Strang paart sich mit dem gegenüber liegendem Strang des Bruchs und die Lücken werden durch Polymerasen wieder aufgefüllt. Dadurch entsteht stets ein *non-crossover* (NCO)-Produkt. Alternativ kann der eingewanderte Strang durch extensive DNA-Synthese so weit verlängert werden, dass er in einem *second-end capture* Mechanismus von dem gegenüberliegenden Ende des Bruchs gebunden werden kann. Die daraus resultierende Struktur ist eine doppelte *Holliday junction* (dHJ), die über zwei verschiedene Wege aufgelöst werden kann. Der RTR-Komplex, bestehend aus einer Helikase, einer Topoisomerase und einem Strukturprotein bewirken die Dissolution der dHJ. Dabei schiebt die Helikase die Kreuzungspunkte aufeinander zu, wodurch ein Hemikatenan entsteht, welches durch die Topoisomerase in ein NCO-Produkt aufgelöst werden kann. Alternativ kann die dHJ durch Resolvasen prozessiert werden. Je nach Orientierung der Schnitte können hierbei NCO oder *crossover* (CO)-Produkte entstehen.

1.2.5 Der RTR-Komplex

Der konservierte RTR-Komplex trägt in Eukaryoten, mitunter durch seine Funktion als dHJ Dissolvasom, einen wesentlichen Anteil zum Erhalt der Genomintegrität bei. In Pflanzen besteht der Komplex aus der Helikase RECQ4A, der Topoisomerase TOP3 α und den Strukturproteinen RMI1 und RMI2 (Knoll *et al.*, 2014b). Das entsprechende Homolog für die Helikase RECQ4A wird in Hefe als Sgs1 und im Menschen als BLM bezeichnet. Der menschliche BTR-Komplex (BLM, TOP3 α , RMI) verfügt genau wie der pflanzliche RTR-Komplex über zwei Strukturproteine - RMI1 und RMI2 -, während der entsprechende STR-Komplex (Sgs1, Top3, Rmi1) aus Hefe nur ein Strukturprotein – Rmi1, beinhaltet (Mankouri & Hickson, 2007; Singh *et al.*, 2008). Alle Faktoren des RTR-Komplexes sind hochkonserviert und daher in allen Organismen sehr ähnlich aufgebaut. Die Helikase RECQ4A verfügt über eine konservierte Helikase Domäne, mit welcher sie die Entwindung der DNA katalysieren kann. Des Weiteren weist sie eine konservierte RecQ- Helikasen spezifische RQC Domäne auf, die potenziell für die Erkennung spezifischer DNA-Substrate, wie dHJs, Replikationsgabeln oder G-Quadruplexe verantwortlich ist, sowie eine konservierte HRDC (Helikase- und RNaseD C-terminal) Domäne, welche vermutlich als Verstärker bei der DNA-Prozessierung und Erkennung wirkt (Morozov *et al.*, 1997; Bernstein & Keck, 2005; Vindigni & Hickson, 2009; Manthei & Keck, 2013; Schröpfer *et al.*, 2014b). Bei der Topoisomerase TOP3 α bilden die Zentraldomäne und die N-terminale TOPRIM Domäne das aktive Zentrum des Enzyms. In diesem befindet sich ein aktives Tyrosyl, welches das Phosphatrückgrat der DNA nukleophil attackieren und dadurch einen Einzelstrangbruch erzeugen kann (Shuman *et al.*, 1989; Bocquet *et al.*, 2014). Durch diesen Einzelstrangbruch, kann nun der intakte DNA Strang hindurchgeführt und die DNA somit relaxiert werden. Neben der Zentral- und der TOPRIM Domäne, weist TOP3 α im C-Terminus vier Zinkfingerdomänen auf. Für diese konnte gezeigt werden, dass sie essentiell für die Erkennung des zu prozessierenden DNA-Substrats sind (Dorn *et al.*, 2018). Die Strukturproteine RMI1 und RMI2 verfügen, im Gegensatz zu TOP3 α und RECQ4A, über keine besonderen katalytischen Funktionen, sind aber essentiell für die Assemblierung und Stabilisierung des Komplexes, sowie für die Signalgebung bei der Dissolution (Mullen *et al.*, 2005). Im N-Terminus von RMI1 befindet sich eine Domäne unbekannter Funktion (*domain of unknown function*, DUF), auf die zwei OB (*oligonucleotide/oligosaccharide binding*) Domänen folgen, welche die Interaktion mit den anderen Komplexpartnern vermitteln (Bonnet *et al.*, 2013). Für die Homologe aus Tieren konnte gezeigt werden, dass die N-terminale OB1 Domäne für die Interaktion mit den Komplexpartnern RECQ und TOP3 α benötigt wird, während die C-terminale OB2 Domäne von RMI1 in den Kontakt zu HsRMI2 vermittelt. RMI2 ist im Gegensatz dazu ein sehr kleines Protein und besteht fast nur aus einer OB3 Domäne, die wiederum für die Interaktion mit RMI1 benötigt wird (Xu *et al.*, 2008).

Der RTR-Komplex trägt einen wesentlichen Beitrag zum Erhalt der Genomintegrität bei, indem er die Entstehung von CO Produkten supprimiert. Dies bewirkt er vermutlich gleich durch zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen, indem er die dHJ bei der HR in NCO Produkte auflöst und dadurch den dHJ-Resolvasen weniger Substrat lässt um CO Produkte zu generieren (Wu & Hickson, 2003). Zum anderen,

konnte für die Hefe Homologe *in vitro* gezeigt werden, dass alle Faktoren des STR-Komplexes an der Dissoziation von proteingebundenen D-Loops beteiligt sind, wodurch die DSB-Reparatur in den SDSA-Weg kanalisiert und bereits die Bildung einer dHJ verhindert wird (Fasching *et al.*, 2015). Das Resultat der DSB Reparatur über den SDSA Weg ist, wie in Absatz 1.2.4 beschrieben, immer ein NCO Produkt, während bei der Auflösung von dHJs auch CO Produkte entstehen können. Da der Verlust einzelner Faktoren des RTR-Komplexes mit Hyperrekombination und der damit einhergehenden vermehrten Entstehung von CO-Produkten verbunden ist, werden sie auch als Antirekombinasen bezeichnet. Der Hyperrekombinationsphänotyp, der in Tieren und in Hefe beschrieben wurde, konnte auch für alle *Arabidopsis* Homologe des RTR-Komplexes nachgewiesen werden (Hartung *et al.*, 2007; Hartung *et al.*, 2008; Röhrig *et al.*, 2016). Abseits dieser CO unterdrückenden Funktion ist der RTR-Komplex noch in einigen weiteren DNA-Reparaturprozessen involviert. In Hefe und in Säugern konnte mitunter gezeigt werden, dass der gesamte Komplex bei der verstärkten 5'-Endresektion zur Initiation der HR beteiligt ist. Dabei stimulieren BLM/Sgs1 die Aktivität der Exonukleasen und verschaffen diesen Zugang durch ihre Helikaseaktivität. Die restlichen Komplexpartner stimulieren wiederum die Aktivität der RECQ4A Homologe (Zhu *et al.*, 2008; Cejka *et al.*, 2010; Nimonkar *et al.*, 2011; Cejka *et al.*, 2012; Bythell-Douglas & Deans, 2021). Durch die Interaktion mit einer Untereinheit der Polymerase δ wurde für den menschlichen BTR-Komplex eine Funktion in der Wiederherstellung der Replikationsgabel postuliert. Ist bei einem einseitigen DSB kein zweites Bruchende zur Verknüpfung in Reichweite, stimuliert BLM die Prozessivität der Polymerase und damit die Vergrößerung des D-Loops während der replikationsassoziierten HR (Selak *et al.*, 2008).

Der RTR-Komplex ist jedoch nicht in allen Reparaturprozessen als Komplex beteiligt. Für einige zelluläre Prozesse werden nur einzelne Faktoren benötigt. Dies wird bereits durch die verschiedenen Phänotypen der einzelnen Mutanten ersichtlich. Die Abwesenheit von BLM, führt im Menschen zu einer Erbkrankheit, die allgemein als Bloom Syndrom bekannt ist und mit Kleinwüchsigkeit, einer Prädisposition für Krebs und einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV-Strahlung verknüpft ist (German, 1993; Ellis *et al.*, 1995). Pflanzliche *recq4A* Mutanten, weisen dagegen einen weitgehend normalen Phänotyp auf, sind aber hypersensitiv gegenüber der Exposition bestimmter Genotoxine, wie z.B. Cisplatin und MMS und weisen den klassischen Hyperrekombinationsphänotyp auf. (Hartung *et al.*, 2007). Ein simultaner Verlust von RECQ4A und der dHJ Resolvase MUS81, führt in *Arabidopsis* weiterhin zu einer konservierten synthetischen Letalität, die zuvor bereits in Pilzen und in Tieren beobachtet werden konnte (Boddy *et al.*, 2000; Mullen *et al.*, 2001; Hartung *et al.*, 2006; Trowbridge *et al.*, 2007). Da beide Faktoren in parallelen Wegen an der Auflösung von Rekombinationsintermediaten beteiligt sind - MUS81 bei der Resolution und RECQ4A bei der Dissolution - ist dieser Effekt auf die Ansammlung von toxischen Rekombinationsintermediaten zurückzuführen. Dies konnte bestätigt werden, da sowohl die Unterdrückung der HR, als auch die heterologe Expression der Resolvase Rusa aus *Escherichia coli* die synthetische Letalität in Pflanzen aufheben konnte (Mannuss *et al.*, 2010; Dorn *et al.*, 2018). Durch *in vitro* Analysen konnte weiterhin gezeigt werden, dass RECQ4A mit der

Helikasefunktion an der Regression von Replikationsgabeln und beteiligt ist (Schröpfer *et al.*, 2014b). *Loss of function* Mutationen in *TOP3a* sind in Tieren mit Embryoletalität und in Hefe mit geringem Wachstum und Fertilitätseinschränkungen assoziiert (Wallis *et al.*, 1989; Li & Wang, 1998). Arabidopsis Pflanzen mit einer *loss of function* Mutation in *TOP3a* sind zwar lebensfähig, weisen aber mit stark verkürzten Wurzeln, deformierten Blättern und Kleinwüchsigkeit starke morphologische Defekte auf (Hartung *et al.*, 2008; Dorn *et al.*, 2018). Auf zellulärer Ebene konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Verlust von *TOP3a* zu einer hohen Frequenz an mitotischen Aberrationen führt, darauf hinweisend, dass *TOP3a* essentielle Funktionen bei der Resolution der Schwesterchromatiden während der Mitose einnimmt (Hartung *et al.*, 2008). Überdies sind *Attop3a* Mutanten steril und weisen starke Defekte während der Meiose auf. Auch *Atrmi1-1 knock out* Mutanten sind steril und zeigen übereinstimmende Defekte während der Meiose auf. Dies deutet darauf hin, dass die beiden Faktoren, unabhängig von *RECQ4A*, in der Lage sind komplexe Strukturen - sogenannte *Joint molecules* - die während der Meiose entstehen, aufzulösen (Hartung *et al.*, 2008; Knoll *et al.*, 2014b). Abgesehen von der Sterilität weisen *Atrmi1-1*, im Gegensatz zu *Attop3a* Mutanten aber einen weitestgehend normalen Phänotyp auf, wodurch die spezielle Funktion von *TOP3a* zum Erhalt der Genomintegrität noch stärker verdeutlicht wird. Im Gegensatz zu den sterilen *Atrmi1-1* Mutanten, sind *Atrmi1-2* Mutanten, die nur eine *loss of function* Mutation in der OB2 Domäne aufweisen, fertil und weisen nur eine leichte Sensitivität gegenüber den Genotoxinen MMS und Cisplatin auf (Bonnet *et al.*, 2013). *Atrmi2*-Mutanten hingegen zeigen einen normalen Wachstumsphänotyp und wiesen nur bei zusätzlichen Defekten in anderen DNA-Reparaturfaktoren Wachstumsanomalien und erhöhte Empfindlichkeiten gegen bestimmte Genotoxine auf (Röhrig *et al.*, 2016).

1.3 REPARATUR VON DNA-PROTEIN *CROSSLINKS*

Ein weiterer Schaden, der nicht allein durch die klassischen DNA-Reparaturwege behoben werden kann, sind kovalente Quervernetzungen zwischen einem Protein und der DNA (*DNA-protein crosslink*, DPC). Ähnlich wie die DSB stellen sie einen sehr häufig auftretenden Schaden dar, der durch zahlreiche exogene und endogene Faktoren induziert werden kann. DPCs verkörpern ein sperriges Hindernis und können dementsprechend Chromatin-basierte Prozesse wie Replikation, Transkription oder Rekombination physisch blockieren. Das kann in Folge fatale Konsequenzen, in Form einer Verzögerung des Zellzyklus, über die Entstehung von Mutationen, bis hin zum Zelltod, haben (Ide *et al.*, 2011). Um diese Folgen zu vermeiden, müssen DPCs rechtzeitig aufgelöst werden. DPCs sind vielfältig hinsichtlich ihrer physikochemikalischen Eigenschaften und benötigen je nachdem auch unterschiedliche Reparaturmechanismen. Im Generellen können sich DPCs in ihrem Protein Typus, in der Art der Quervernetzung und in dem Vorhandensein, bzw. der Art eines angrenzenden DNA-Bruchs unterscheiden (Ide *et al.*, 2018). Um mit der Komplexität dieser Schäden zurechtzukommen, haben sich

im Laufe der Evolution eine Vielzahl unterschiedlichster Mechanismen entwickelt, die erst in den letzten zehn Jahren intensiver erforscht wurden (Stingele *et al.*, 2017).

1.3.1 Entstehung und Arten von DPCs

Im Allgemeinen können DPCs in zwei verschiedene Klassen unterteilt werden: nicht-enzymatische und enzymatische DPCs (Stingele *et al.*, 2017). Nicht-enzymatische DPCs sind von Natur aus vielfältig, da es sich um spontane Quervernetzungen zwischen DNA und Proteinen, die sich in unmittelbarer Nähe befinden, handelt, die durch eine Vielzahl von Faktoren verursacht werden können. Exogen können z.B. UV- und ionisierende Strahlung, durch die direkte Einwirkung auf DNA und Proteine die Bildung von nicht-enzymatischen DPC induzieren, da dadurch freie Radikale innerhalb der Moleküle entstehen, die dann miteinander reagieren können (Nakano *et al.*, 2017). Reaktive Sauerstoffspezies oder reaktive Aldehyde, die als Nebenprodukte bei verschiedenen Stoffwechselprozessen wie der Photosynthese oder der Demethylierung von Histonen entstehen, sind dagegen endogene Quellen für die Entstehung von nicht-enzymatischen DPCs (Smirnoff, 2005; Tsukada *et al.*, 2006; Swenberg *et al.*, 2011). Weiterhin können verschiedenste Chemikalien zur Bildung eines kovalenten DPCs führen. Hierzu gehören unter anderem Metallverbindungen wie Cisplatin, oder auch reaktive Chemikalien wie Formaldehyd (Solomon & Varshavsky, 1985; Cohen & Lippard, 2001). Bei enzymatischen DPCs handelt es sich dagegen um DNA-prozessierende Enzyme, die während einer fehlgeschlagenen katalytischen Reaktion an der DNA kovalent an diese gebunden werden (Stingele *et al.*, 2017). Die prominentesten Arten von enzymatischen DPC sind Quervernetzungen zwischen Topoisomerasen und der DNA (Ide *et al.*, 2018). Topoisomerasen sind hochkonservierte, essentielle Enzyme in allen Lebewesen, da sie Torsionsspannungen in der DNA, die im Zusammenhang der Replikation, der Transkription oder der Rekombination entstehen, durch die gezielte Einführung von Schnitten beheben können. Im katalytischen Zentrum einer jeden Topoisomerase befindet sich ein aktiver Tyrosylrest, mit dem sie das Zucker-Phosphatrückgrat der DNA nukleophil angreifen können. Als Folge bildet sich ein Intermediat, in welchem die Topoisomerase über eine Phosphodiesterbindung mit der DNA verknüpft ist. Neben diesem Reaktionsintermediat befindet sich ein Bruch in der DNA, durch den nun der intakte DNA Strang geführt und somit die Verdrillung aufgelöst werden kann. Nach erfolgreicher Reaktion löst sich die Topoisomerase wieder von der DNA, wodurch auch der Bruch wieder geschlossen wird. Ausgehend von der Art der Verdrillung, agieren unterschiedliche Topoisomerasen. Topoisomerasen der Klasse 1 agieren als Monomere und führen einen Einzelstrangbruch in die DNA ein, wodurch sie fähig sind positive und negative *supercoils* in der DNA aufzulösen. Eukaryotische Topoisomerasen der Klasse 1B, die besonders wichtig bei der Transkription und bei Replikation sind, bilden ein Intermediat in welchem sie über das 3'-Ende des Bruchs mit der DNA verknüpft sind. Während der Replikation und der Transkription agieren weiterhin Topoisomerasen der Klasse 2A, indem sie als Dimer einen DSB in die DNA einführen. Durch diesen wird unter ATP-Verbrauch ein zweiter DNA Doppelstrang durchgeführt,

womit sie in der Lage sind auch ringförmig verknottete DNA aufzulösen und sie somit zu dekatenerieren. Topoisomerasen der Klasse 2A sind während ihrer katalytischen Reaktion mit den 5'-Enden eines gestaffelten DSBs assoziiert (Wang, 1996). Die katalytische Reaktion der Topoisomerasen ist normalerweise reversibel, doch unter bestimmten Umständen kann das Reaktionsintermediat gefestigt werden, wodurch kovalente Topoisomerase 1 *cleavage complexes* (TOP1cc), oder äquivalent dazu, Topoisomerase 2 *cleavage complexes* (TOP2cc) entstehen (Deweese & Osheroff, 2009; Pommier *et al.*, 2014). Dies kann auf natürlichem Wege geschehen, wenn sich Schädstellen, wie z.B. apurine Stellen in der Nähe befinden, oder durch spezifische Genotoxine, die gezielt die Re-Ligation nach der Reaktion verhindern. Diese Genotoxine wurden innerhalb dieser Arbeit gezielt eingesetzt um die Reparatur dieser Schäden zu untersuchen und werden daher im Folgenden genauer beschrieben. Camptothecin (CPT) wurde verwendet um die Entstehung von TOP1cc zu induzieren (Hsiang *et al.*, 1989). Bei diesem Genotoxin handelt es sich um ein pentazyklisches Quinolinalkaloid, das als natürliches Sekundärmetabolit des chinesischen Baumes *Camptotheca acuminata* vorkommt (Wall *et al.*, 1966). Es wurde im Rahmen eines *Screens* nach neuen Krebstherapeutika identifiziert und wurde auch dafür verwendet. Aufgrund der geringen Löslichkeit und der vielen Nebenwirkungen wird nun aber nach passenden Derivaten gesucht, die diese Funktion besser erfüllen können (Vesela *et al.*, 2017).

Für die Induktion von TOP2cc wurde dagegen Etoposid (Eto) eingesetzt. Bei diesem Stoff handelt es sich um ein synthetisches Derivat von Podophyllumtoxin, einem Sekundärmetabolit der indischen Podophyllum-Pflanze. Podophyllumtoxin wurde bereits im 19. Jahrhundert als wirksames Zytostatikum gegen Hautkrebs angesehen, brachte jedoch auch eine Reihe unerwünschte Nebeneffekte mit sich (King & Sullivan, 1946). Das Derivat Eto wurde das erste Mal um 1966 synthetisiert und wird seit 1983 als Chemotherapeutikum, unter anderem bei der Behandlung von refraktären Hodentumoren oder kleinzelligem Lungenkrebs, eingesetzt (Hande, 1998; Vesela *et al.*, 2017).

1.3.2 Kanonische DPC Reparaturmechanismen

Aufgrund der Diversität der DPCs sind viele verschiedene Mechanismen notwendig um diese zu reparieren. Zu diesen gehören unter anderem kanonische DNA Reparaturmechanismen, DSB Reparaturmechanismen und spezialisiertere Mechanismen, die direkt den Proteinbestandteil oder die Verbindung zwischen Protein und DNA angreifen. In den meisten Fällen ist ein Zusammenspiel der verschiedenen Reparaturwege erforderlich. Allgemein kann unterschieden werden in Faktoren die zur Reparatur des DPC beitragen und in Mechanismen die zur Toleranz eines DPCs führen (Stingele *et al.*, 2015). Einen wichtigen basalen Reparaturmechanismus beschreibt die NER. Sowohl in Bakterien, als auch in Hefe und Säugern konnte nachgewiesen werden, dass die NER an der Beseitigung von kleineren DPCs beteiligt ist, da entsprechende NER-Reparaturmutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Formaldehyd aufwiesen (Nakano *et al.*, 2007; Graaf *et al.*, 2009; Nakano *et al.*, 2009). Auch in Pflanzen konnte gezeigt werden, dass die NER an der Entfernung von DPCs beteiligt ist, da NER Mutanten eine

erhöhte Sensitivität gegenüber dem Genotoxin Zebularin aufwiesen (Liu *et al.*, 2015). Zebularin ist ein weiterer spezifischer *Crosslinker* der das Reaktionsintermediat der DNA-Methyltransferase (DNMT) an der DNA festigt und damit einen enzymatischen DPC erzeugt (Egger *et al.*, 2004). Für die Entfernung von größeren DPCs durch die NER muss die Proteinkomponente aber vermutlich zunächst durch vorherige Proteolyse, beispielsweise durch das 26S Proteasom, teilweise abgebaut werden (Quievryn & Zhitkovich, 2000; Nakano *et al.*, 2009). Weiterhin können größere DPCs durch einen *template switch* mittels HR Mechanismen umgangen werden. HR-Mutanten von Bakterien, Hefen und Säugern wiesen ebenfalls erhöhte Sensitivitäten gegenüber den DPC induzierenden Substanzen Formaldehyd und 5-Aza-2'-Deoxycytidin, einem weiteren DNMT Inhibitor, auf. DSB Reparaturwege scheinen auch in der pflanzlichen DPC Reparatur eine Rolle zu spielen, da Arabidopsis Mutanten mit einem Defekt in *ATM*, einem Gen, das für ein Protein kodiert welches für die Erkennung und die Signaltransduktion von DSB verantwortlich ist, sensitiv gegenüber Zebularin sind (Liu *et al.*, 2015). Eine spezielle Rolle in der Reparatur von DPCs nimmt außerdem der MRN-Komplex ein (siehe Abschnitt 1.2.2). In Hefe konnte gezeigt werden, dass Zellen mit einem Defekt in *Mre11* sensitiver auf Formaldehyd reagieren, als Zellen die nur defekt in einzelnen HR-Faktoren sind (Graaf *et al.*, 2009). Dies weist darauf hin, dass der MRN-Komplex auch außerhalb seiner Funktion in der HR zur Reparatur von DPCs beiträgt. Neben der Sensitivität gegenüber Formaldehyd konnten in *Xenopus* und in *Schizosaccharomyces pombe mre11* Mutanten eine Sensitivität gegenüber den Topoisomerase Inhibitoren CPT und Eto ausgemacht werden, darauf hinweisend, dass der MRN-Komplex auch bei der Reparatur von TOP1cc und TOP2cc von Bedeutung ist (Hartsuiker *et al.*, 2009; Aparicio *et al.*, 2016). Weiterhin konnte auch in Säugern gezeigt werden, dass der MRN-Komplex DSB mit DNA-Protein Addukten prozessieren kann und somit auch dort zur Reparatur von TOP2cc beiträgt (Deshpande *et al.*, 2016). Der Mechanismus der Entfernung beruht dabei auf der endonukleolytischen Induktion eines Bruchs abseits des DPC, einer nachfolgenden kurzen Resektion in 3'-5' Richtung, woraufhin ein zweiter Bruch in den gegenüberliegenden Strang eingeführt wird. Dadurch wird der DNA-Part mit dem Protein Addukt abgetrennt und der entstandene DSB kann durch DSB-Reparaturmechanismen wieder geschlossen werden (Stinglele *et al.*, 2017). Auch in Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass der MRN-Komplex in der Meiose an der Entfernung des Topoisomerase 2 ähnlichen SPO11-Dimer beteiligt ist, da Meiozyten von *mre11* Mutanten, im Vergleich zu *mre11 spo11* Doppelmutanten, stark fragmentierte Chromosomen aufwiesen (Puizina *et al.*, 2004). Dies weist darauf hin, dass der MRN-Komplex auch in Pflanzen eine Funktion in der DPC-Reparatur innehat. Neben diesen kanonischen Reparaturmechanismen, tragen auch spezifischere Faktoren zur Entfernung der DPCs bei. Die Faktoren die dabei eine Rolle in Pflanzen spielen, werden im Folgenden genauer beschrieben.

1.3.4 DPC Reparatur in Pflanzen

Die Untersuchung der DPC-Reparatur ist erst in den letzten Jahren in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt, wobei Erkenntnisse über die Mechanismen hauptsächlich für Hefe und Metazoen gewonnen wurden. Erst kürzlich wurden auch in Pflanzen drei spezifische Faktoren identifiziert, die DPCs mittels unterschiedlicher Mechanismen reparieren können. Die Endonuklease MUS81 trägt zur DPC Toleranz mittels einer endonukleolytischen Inzision bei, die Protease WSS1A kann den Proteinbestandteil des DPCs proteolytisch abbauen, und die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) kann die Phosphodiesterbindung von TOP1cc auflösen (Abbildung 1.3).

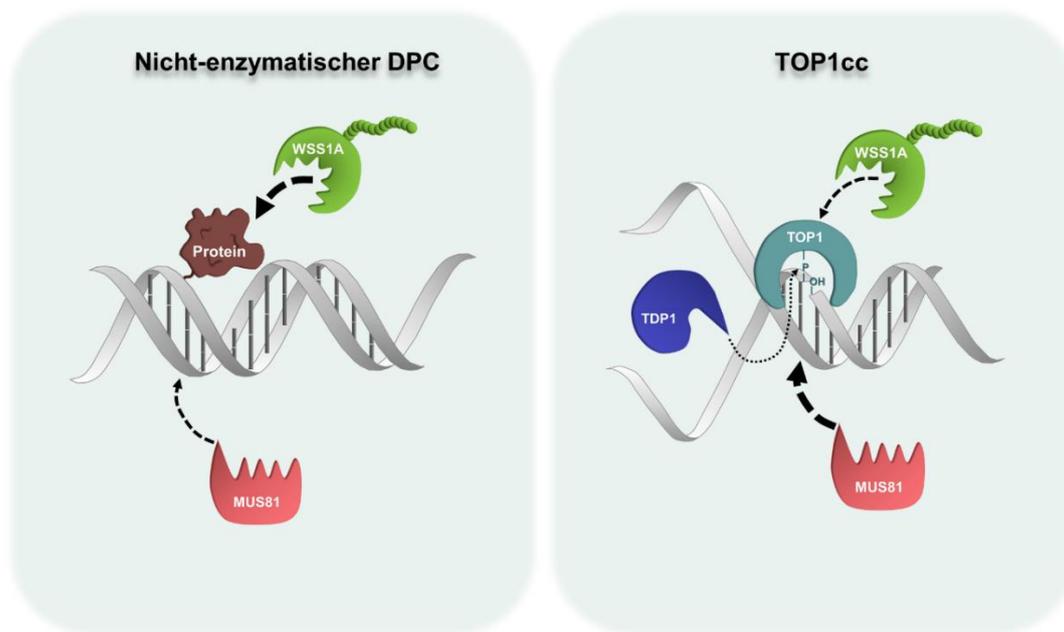


Abbildung 1.3: Reparatur von DNA-Protein *crosslinks* in Pflanzen.

Nicht-enzymatische DNA-Protein *crosslinks* (DPCs) können in Pflanzen entweder durch die proteolytische Aktivität von WSS1A abgebaut werden, oder durch eine endonukleolytische Inzision durch MUS81 und nachfolgende Reparaturwege umgangen werden. Der präferierte Weg in der Reparatur von nicht-enzymatischen DPCs ist die Proteolyse durch WSS1A. Topoisomerase 1 cleavage complexes (TOP1cc) werden dagegen präferiert durch MUS81 repariert, aber die Proteolyse durch WSS1A stellt einen weiteren wichtigen Weg dar. Ist einer der Faktoren abwesend, kann die Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (TDP1) die 3'-Phosphodiesterbindung des TOP1ccs in einem *back-up* Mechanismus auflösen

Aufgrund unterschiedlicher Sensitivitäten der Mutanten gegenüber Cisplatin konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Degradation durch WSS1A den Hauptweg der Reparatur von nicht-enzymatischen DPC darstellt, während die Reparatur durch MUS81 den zweitwichtigsten Weg darstellt. Bei der Reparatur von TOP1cc dagegen, ist die Reparatur durch MUS81 der favorisierte Weg, während die Reparatur durch WSS1A den nächstpräferierten Weg darstellt. Ist einer der beiden Faktoren nicht verfügbar, kann TDP1 den TOP1cc in einem *back-up* Mechanismus auflösen (Enderle *et al.*, 2019).

Im Gegensatz zur Reparatur von nicht-enzymatischen DPC und TOP1cc, ist dagegen in Pflanzen noch nichts über die Reparatur von TOP2cc bekannt. Da sich TOP2cc durch ihre Phosphodiesterbindung,

welche sich am 5'-Ende eines DSB befindet, biochemisch von TOP1cc unterscheiden, bei welchen das Enzym über eine 3'-Phosphodiesterbindung mit einem Einzelstrangbruch assoziiert ist, ist zu erwarten, dass für die Reparatur von TOP2cc auch andere Reparaturmechanismen benötigt werden. In Säugern konnte bereits ein weiteres hochspezialisiertes Enzym – die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 2 (TDP2) - identifiziert werden, welches spezifisch die 5'-Phosphodiesterbindung von TOP2cc auflösen kann (Cortes Ledesma *et al.*, 2009). Auch in Pflanzen konnte ein entsprechendes Homolog durch phylogenetische Analysen identifiziert werden, welches dementsprechend einen vielversprechenden Kandidaten für die pflanzliche Reparatur von TOP2cc darstellt (Confalonieri *et al.*, 2014). Alle in diesem Abschnitt genannten Faktoren wurden in dieser Arbeit genauer behandelt und werden daher im Folgenden genauer beschrieben.

1.3.5 Die Protease WSS1A

Die Existenz einer Protease, die spezifisch Proteine, die mit der DNA assoziiert sind, abbaut, wurde erstmals in Hefe entdeckt. Für die Metalloprotease ScWss1 (*weak suppressor of smt3*) konnte dabei gezeigt werden, dass sie durch Bindung an ssDNA in der Lage ist den Proteinpart eines DPCs proteolytisch abzubauen (Stingele *et al.*, 2014). Wss1 ist eine Protease mit einem weiten Substratspektrum, weshalb die Proteolyse unabhängig von Protein-Typus und von der Art der Bindung erfolgt (Abbildung 1.4). Um zu verhindern, dass sie sämtliche Proteine innerhalb des Zellkerns abbaut, bedarf es deshalb mehrerer Ebenen der Regulation. In Hefe konnte gezeigt werden, dass Wss1 sich selbst degradiert, wenn es an doppelsträngige DNA bindet, während die Bindung an ssDNA die Proteolyse von Fremdproteinen fördert. Für die Erfüllung der vollständigen Funktion von Wss1, muss dieses weiterhin durch SUMO (*Small Ubiquitin related modifier*) aktiviert werden (Stingele *et al.*, 2014). In Hefe wurde demonstriert, dass TOP1cc und wahrscheinlich auch andere DPCs durch SUMO Ligasen stark SUMOyliert werden, weshalb die Vermutung naheliegt, dass Wss1 die SUMOylierung mit seiner SIM-Domäne (*SUMO interacting motif*) erkennen und dadurch an die Schadstellen rekrutiert wird (Psakhye & Jentsch, 2012; Jentsch & Psakhye, 2013). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Wss1 für seine zelluläre Funktion essentiell mit der Zellzyklus Segregase Cdc48 interagieren muss. Hierbei wird vermutet, dass Cdc48 die Proteolyse für Wss1 erleichtert, indem es die mit der DNA verknüpften Proteine entfaltet. Nach der Wss1 vermittelten Proteolyse des DPCs verbleibt nur noch ein kleiner Peptidrest an der DNA, der in der G-Phase vermutlich durch NER entfernt und in der S-Phase durch die Transkriptionssynthese umgangen werden kann (Stingele *et al.*, 2014).

Das funktionelle Homolog von Wss1 in Säugern heißt SPRTN (Stingele *et al.*, 2016; Vaz *et al.*, 2016). Obwohl es kein direktes Ortholog von Wss1 darstellt, haben sich viele funktionelle Eigenschaften konvergent entwickelt (Reinking *et al.*, 2020a). Ebenso wie Wss1 ist für die zelluläre Funktion von SPRTN die Interaktion mit der Zellzyklussegeregase p97, dem Homolog von Cdc48, von Wichtigkeit. Der spezifische Abbau von DPCs durch SPRTN wird durch die Interaktion von SPRTN mit der

replikationsassoziierten Ringklemme PCNA abgesichert (Mosbech *et al.*, 2012; Stingele *et al.*, 2015). Während SPRTN allerdings vornehmlich in der S-Phase exprimiert wird, wird Wss1 während des gesamten Zellzyklus auf einem niedrigen Level exprimiert (Maskey *et al.*, 2014; Kwesi Sam, 2020). Eine Defizienz von Wss1 in Hefe äußert sich in verstärkter Sensitivität gegenüber Formaldehyd und, in Kombination mit einem zusätzlichen Defekt in Tdp1, in einer erhöhten Sensitivität gegenüber CPT. Ansonsten weisen die Hefezellen ein weitgehend normales Wachstum mit einer erhöhten Rekombinationsrate auf (Kanellis *et al.*, 2007; Stingele *et al.*, 2014). Eine *loss of function* Mutation in SPRTN führt dagegen in Säugern zu Embryoletalität und selbst ein partieller Verlust von SPRTN hat ernsthafte Folgen und ist assoziiert mit dem Ruijs-Aalfs-Syndrom, einer Erbkrankheit die mit Krebs und frühzeitiger Alterung einhergeht (Lessel *et al.*, 2014; Maskey *et al.*, 2014). Neben SPRTN konnte in Metazoen jüngstens eine weitere DPC- Protease -GCNA (*germ cell nuclear antigen*) - charakterisiert werden, der wohl eine besondere Rolle bei der Beseitigung von DPCs während der Meiose zukommt (Dokshin *et al.*, 2020). Auch in Hefe konnte nachgewiesen werden, dass Ddi1 (*DNA damage inducible*) eine weitere Protease ist, die parallel zu Wss1 in der DPC Proteolyse partizipiert (Serbyn *et al.*, 2020; Yip *et al.*, 2020).

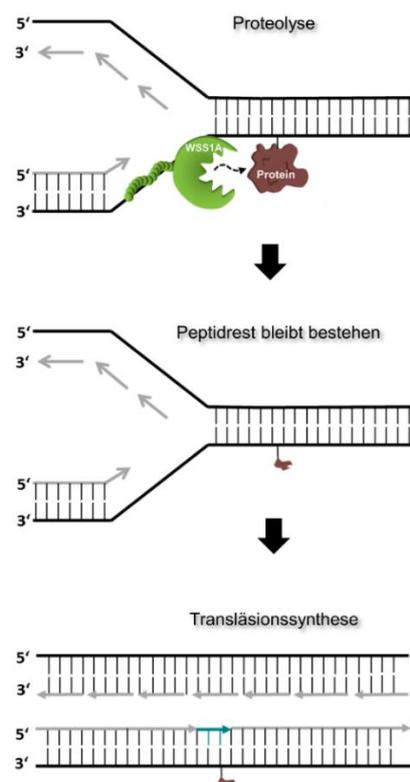


Abbildung 1.4: Mechanismus der DNA-Protein crosslink Reparatur durch WSS1A.

Für die Entfaltung der katalytischen Aktivität zum Abbau von Fremdproteinen, muss WSS1A an einzelsträngige DNA binden. Die proteolytische Degradation des DNA-Protein crosslinks (DPC) erfolgt unabhängig von der Art des Proteins und der Crosslink-Bindung. Nach der Proteolyse bleibt ein kleiner Peptidrest bestehen. Dieser kann während der Replikation durch eine Transläsionspolymerase umgangen werden. Dieser Mechanismus ist allerdings fehleranfällig und ist mit der Entstehung von Punktmutationen assoziiert.

Bioinformatische Analysen ergaben interessanterweise, dass monokotyle Pflanzen wie Mais oder Reis sowohl über ein SPRTN-Homolog als auch über zwei Wss1-Homologe - WSS1A und WSS1B – verfügen (Vaz *et al.*, 2017). Über die Funktion des SPRTN-Homolog in Pflanzen ist bisher jedoch nichts bekannt. Dikotyle Pflanzen wie *Arabidopsis* dagegen, verfügen ebenfalls über die beiden Homologe WSS1A und WSS1B, aber ein SPRTN Homolog konnte nicht identifiziert werden. Analysen zur Funktion der beiden WSS1-Homologe zeigten, dass nur WSS1A an der DPC-Reparatur in Pflanzen beteiligt ist, während für das WSS1B-Homolog noch keine Funktion nachgewiesen werden konnte. Die CRISPR/Cas generierte Knockout Mutantenlinie von *Atwss1A*, aber nicht von *Atwss1B*, wies eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cisplatin und CPT auf. Dies bedeutet, dass WSS1A auch in Pflanzen an der Reparatur von nicht-enzymatischen DPC und TOP1cc beteiligt ist. Weiterhin wiesen die *Atwss1A* Mutanten einen faszierten Phänotyp, eine stark reduzierte Wurzellänge, reduzierte Fertilität und eine erhöhte Anzahl von toten Zellen im Wurzelmeristem auf, was auf eine elementare Funktion von WSS1A für die pflanzliche Genomstabilität hinweist (Enderle *et al.*, 2019).

1.3.6 Die Endonuklease MUS81

MUS81 (*MMS and UV-sensitive protein 81*) ist eine strukturspezifische Endonuklease, die innerhalb der Eukaryoten hochkonserviert ist und, zusammen mit ihrem Interaktionspartner EME1 (*Mms4* in Hefe), an einer Vielzahl unterschiedlicher Reparaturprozesse beteiligt ist (Interthal & Heyer, 2000). Der Mechanismus mit welchem MUS81 DNA-Substrate prozessiert ist ein *nick-counternick* Mechanismus, bei welchem MUS81 einen Bruch gegenüber eines anderen, bereits vorhandenen Bruchs, induziert (Gaillard *et al.*, 2003). Mit diesem Mechanismus kann sie verschiedenste DNA-Intermediate, wie zum Beispiel, blockierte Replikationsgabeln, 3'-*flaps*, *D-Loops*, beschädigte dHJs, oder, zu einem geringeren Anteil auch intakte dHJs, schneiden (Fricke *et al.*, 2005; Taylor & McGowan, 2008; Geuting *et al.*, 2009). Aufgrund ihrer Fähigkeit dHJs zu prozessieren, gilt sie auch als dHJ Resolvase und trägt dadurch in der Meiose zur Bildung von CO-Produkten bei (Osman *et al.*, 2003; Berchowitz *et al.*, 2007; Holloway *et al.*, 2008). In der somatischen DNA-Reparatur trägt sie zur Toleranz von Schäden, die während der Replikation bestehen bei, indem sie an blockierten Replikationsgabeln einen einseitigen DSB erzeugt, wodurch nachfolgende DSB-Reparaturwege aktiviert werden, die dabei helfen den Schaden zu umgehen (Hanada *et al.*, 2006). Dieser Mechanismus ist vor allem bei der Reparatur von DNA-Quervernetzungen und bei der Reparatur von DPCs von Bedeutung (Hanada *et al.*, 2006; Enderle *et al.*, 2019). Sowohl in Hefe, als auch in Pflanzen und Tieren konnte festgestellt werden, dass Mutanten mit einem Defekt in MUS81 eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber CPT aufweisen (Liu *et al.*, 2002; Regairaz *et al.*, 2011; Enderle *et al.*, 2019). Dies indiziert, dass MUS81 besonders bei der Reparatur von TOP1cc eine wichtige Funktion erfüllt. Für den Mechanismus der Reparatur von TOP1cc durch MUS81 wurden zwei verschiedene Modelle vorgeschlagen (Abbildung 1.5). Die Gruppe von Yves Pommier vermutet, dass MUS81 einen DSB an der blockierten Replikationsgabel erzeugt und somit

Torsionsspannungen in der DNA löst, die infolge der abortiven Reaktion der Topoisomerase 1 nicht behoben werden konnten (Abbildung 1.5 A) (Regairaz *et al.*, 2011). Die Gruppe von Phillippe Pasero stellte dagegen ein Modell vor, in welchem MUS81 nach der Regression und der anschließenden Wiederherstellung der Replikationsgabel durch HR, an der Terminierung der Wiederherstellung beteiligt ist. Durch die Wiederherstellung entstehen rekombinationsartige Strukturen in der DNA, die für den erfolgreichen Fortlauf der Replikationsgabel zunächst durch MUS81 geschnitten werden müssen (Abbildung 1.5 B) (Pardo *et al.*, 2020).

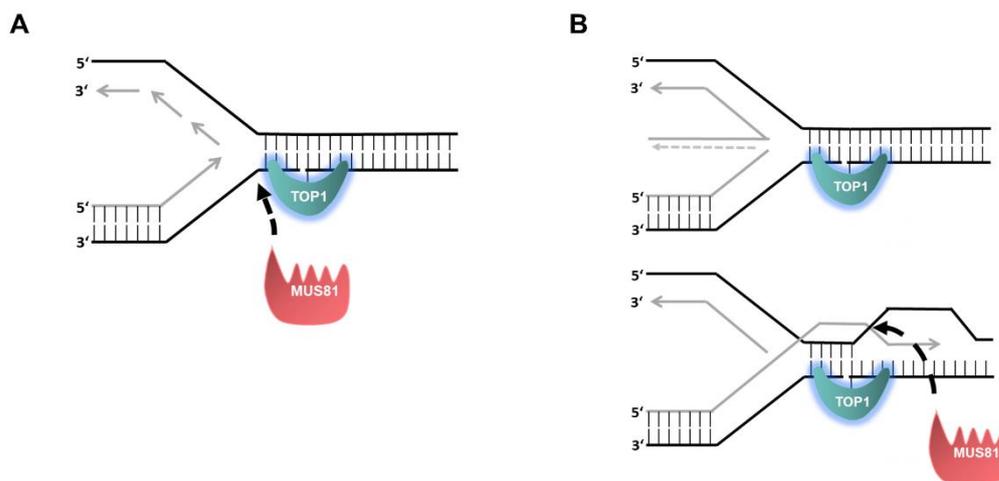


Abbildung 1.5: Modelle zum Mechanismus der MUS81 vermittelten DNA-Protein crosslink Toleranz.

A) Modell von Regairaz *et al.* 2011: MUS81 induziert einen einseitigen Doppelstrangbruch (DSB) an der angehaltenen Replikationsgabel und löst damit Torsionsspannungen in der DNA, die durch die abortive Reaktion der Topoisomerase 1 (TOP1) nicht gelöst werden konnten. Der einseitige DSB kann nachfolgend durch die Homologe Rekombination (HR) wieder geschlossen werden. **B)** Modell von Pardo *et al.* 2019: Der Topoisomerase 1 cleavage complex (TOP1cc) wird durch *template switch* Mechanismen wie der Regression der Replikationsgabel, oder der HR umgangen. Bei der Fusion mit der konvergierenden Replikationsgabel entstehen rekombinationsartige Strukturen, die durch MUS81, zur Terminierung der Reaktion, aufgelöst werden müssen

Atmus81 Mutanten weisen leicht verkürzte Wurzeln, eine reduzierte Pollenvitalität und konservierte Sensitivitäten gegenüber den Genotoxinen MMS, MMC, Cisplatin und CPT auf (Hartung *et al.*, 2006; Berchowitz *et al.*, 2007). Charakteristisch ist außerdem die konservierte synthetische Letalität der *recq4A mus81* Doppelmutante, die ebenso in Hefe und Tieren beobachtet werden konnte und die auf eine Akkumulation toxischer Rekombinationsintermediate zurückzuführen ist (Abschnitt 1.2.7) (Boddy *et al.*, 2000; Mullen *et al.*, 2001; Hartung *et al.*, 2006; Trowbridge *et al.*, 2007)

1.3.7 Die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1)

Die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) ist ein spezialisiertes Enzym, das in der Lage ist, die 3'-Phosphodiesterbindung zwischen dem aktiven Tyrosyl der Topoisomerase 1 (TOP1) und dem DNA-Rückgrat zu hydrolysieren und somit aufzulösen (Abbildung 1.6). TDP1 ist hochkonserviert in eukaryotischen Organismen und seine 3'-Phosphodiesterase -Aktivität konnte bereits 1996 in Hefe entdeckt werden (Yang *et al.*, 1996; Pouliot *et al.*, 1999). Vor der Hydrolyse durch TDP1 bedarf es einer partiellen Degradation der TOP1 durch das Proteasom, da die Phosphodiester-Verbindung aufgrund der Größe der Topoisomerase sonst unzugänglich ist (Desai *et al.*, 2001; Interthal & Champoux, 2011). Nach der TDP1-vermittelten Hydrolyse des *Crosslinks* verbleibt ein 3'-Phosphat an der DNA, das eine einfache Re-Ligation des Einzelstrangbruchs verhindert, sodass eine weitere Prozessierung der Läsion erforderlich ist. Sowohl im Menschen als auch in Hefe konnte gezeigt werden, dass das 3'-Phosphat durch PNKP (Polynukleotid-Kinase/Phosphatase) entfernt und der noch verbleibende Einzelstrangbruch in Hefe durch HR Mechanismen und im Menschen durch die *short-patch* BER (Abschnitt 1.1.3) repariert werden kann (Jilani *et al.*, 1999; Pouliot *et al.*, 2001; Meijer *et al.*, 2002; Plo, 2003). Neben der Funktion in der Reparatur von TOP1ccs, ist TDP1 in Hefe und in Säugern zusätzlich sowohl in der Auflösung von weiteren 3'-DNA-Addukten, als auch als *back-up* Mechanismus bei der Reparatur von TOP2cc involviert (Nitiss *et al.*, 2006; Murai *et al.*, 2012; Pommier *et al.*, 2014). Bei der Aktivität von TDP1 gibt es mehrere zugrunde liegende Regulationsmechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion des Sensorproteins PARP1 mit TDP1 zu einer N-terminalen PARylierung von TDP1 führt, wodurch es stabilisiert und zu TOP1cc in proliferierenden Zellen rekrutiert wird. TDP1 kann auch an Lysin 111 SUMOyliert werden, wodurch es zu TOP1cc in transkriptionell aktiven Bereichen rekrutiert wird (Hudson *et al.*, 2012). Da TOP1cc mit einem Einzelstrangbruch assoziiert sind, führt das Auftreffen der Replikationsgabel auf einen TOP1cc im Leitstrang zu einem einseitigen DSB (Strumberg *et al.*, 2000). Infolgedessen wird TDP1 durch die DSB-erkennenden Signalproteine ATM und DNA-PK phosphoryliert und zu dem TOP1cc induzierten DSB rekrutiert, wodurch die nachfolgende Reparatur des DSB erleichtert wird (Das *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2010). In verschiedenen Organismen kommt TDP1 eine unterschiedlich starke Bedeutung in der Reparatur von TOP1cc zugute. In Hefe weisen Mutanten mit einem Defekt in *Tdp1* nur dann eine verstärkte Sensitivität gegenüber CPT auf, wenn mindestens ein weiteres Enzym, das an der Reparatur von TOP1cc beteiligt ist, fehlt (Vance & Wilson, 2002; Kawale & Povirk, 2018). In Vertebraten ist der Verlust von TDP1 dagegen folgenschwerer, da *TDP1*^{-/-} Einzelmutanten bereits eine Hypersensitivität gegenüber CPT aufweisen (Murai *et al.*, 2012). In Arabidopsis wiederum, ist die Bedeutung von TDP1 in der Reparatur von TOP1cc eher mit der in Hefe vergleichbar, da *Attdp1* Mutanten einen normalen Phänotyp aufweisen, und nur dann hypersensitiv auf CPT reagieren wenn ein zusätzlicher Defekt in entweder *WSS1A*, oder in *MUS81*, vorliegt (Enderle *et al.*, 2019).

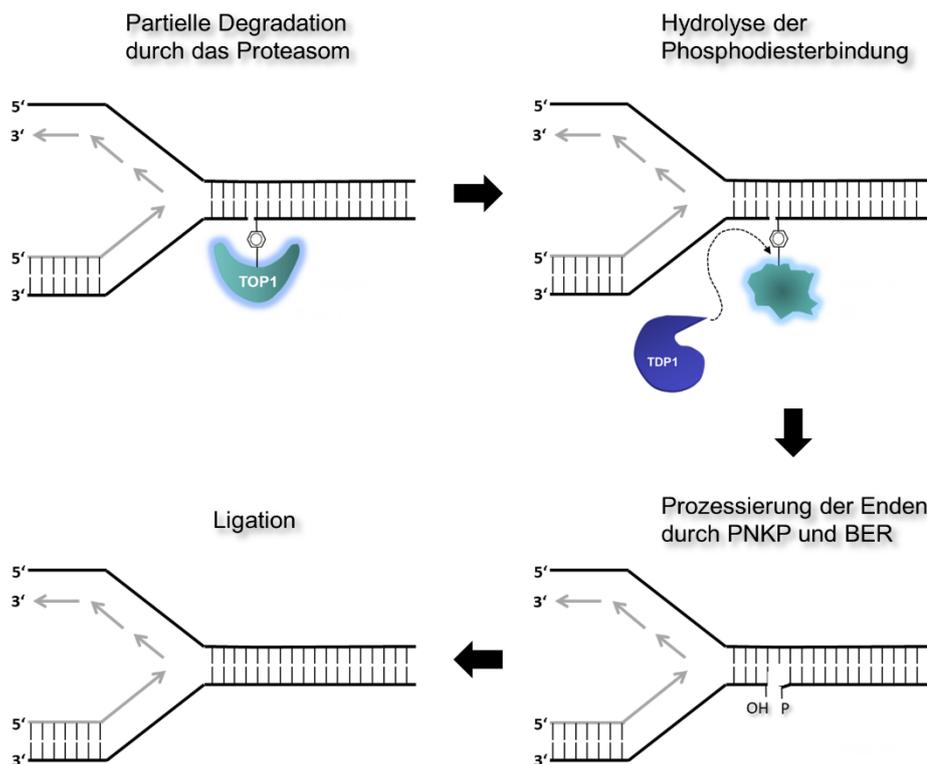


Abbildung 1.6: Mechanismus der Reparatur von Topoisomerase 1 *cleavage complexes* durch TDP1.

Um TDP1 Zugang zu der Phosphodiesterbindung zu verschaffen, wird die Topoisomerase 1 (TOP1) zunächst partiell durch das Proteasom degradiert. Anschließend kann TDP1 mit seiner 3'-Phosphodiesteraseaktivität die Bindung zwischen TOP1 und der DNA auflösen. Danach verbleibt am 3'-Ende der DNA ein Phosphatrest, der durch die Polynukleotid-Kinase/Phosphatase (PNKP) entfernt werden muss. Der verbleibende Einzelstrangbruch kann anschließend durch die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) geschlossen werden.

1.3.8 Die Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 2 (TDP2)

In Säugern konnte ein weiteres hochspezialisiertes Enzym identifiziert werden – die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 2 (TDP2) – welches in der Lage ist die 5'-Phosphodiesterbindung zwischen der Topoisomerase 2 (TOP2) und der DNA aufzulösen. TDP2 war zuvor durch seine Funktion als Signalprotein, mit einer Beteiligung an der Regulation von Transkription, Apoptose und Gewebeentwicklung, bereits unter den Namen TTRAP oder EAP2 bekannt (Li *et al.*, 2011). Die 5'-Phosphodiesterase Aktivität, konnte 2009 mittels eines heterologen Komplementationsscreenings von TOP1cc-Reparatur defizienten *tdp1Δ rad1Δ* Hefezellen nachgewiesen werden. Die Hefezellen die mit der cDNA von HsTDP2 komplementiert wurden, wiesen dabei eine erhöhte Resistenz gegenüber CPT auf, darauf hinweisend, dass TDP2 in der Reparatur von TOP1cc beteiligt ist. Im spezielleren, konnte aber auch gezeigt werden, dass HsTDP2 überexprimierende Hefezellen eine erhöhte Resistenz gegenüber Eto aufwiesen und TDP2 defiziente Humanzellkulturen dafür mit einer verstärkten Sensitivität auf Eto reagierten. Da die HsTDP2^{-/-} Mutanten nur sensitiv auf Topoisomerase-Inhibitoren, aber nicht auf andere DNA-schädigende Substanzen wie MMS reagierten, wurde auf eine

Phosphodiesterase-Aktivität geschlossen und das Enzym in TDP2 umbenannt (Cortes Ledesma *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2011). Damit TDP2 die Phosphodiesterbindung hydrolysieren kann, muss diese zunächst zugänglich gemacht werden. Dies kann über zwei unterschiedliche Wege erfolgen. Der erste ist der vorangehende proteolytische Abbau von TOP2 durch das Proteasom. In einem zweiten Weg, begeht TOP2, nach der ZNT451/ZATT-vermittelten (*Zingfinger protein associated with TDP1 and TDP2*) SUMOylierung eine Konformationsänderung, wodurch die Phosphodiesterbindung freigelegt wird. Im gleichen Zug wird TDP2 aktiviert und rekrutiert und kann die Bindung in Folge, ohne eine vorhergehende Proteolyse von TOP2, auflösen (Schellenberg *et al.*, 2017; Zagnoli-Vieira & Caldecott, 2017). Nachdem die Bindung aufgelöst wurde, bleibt ein DSB mit einem 5'-Phosphatrest bestehen. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieser DSB, durch cNHEJ direkt wieder geschlossen werden kann (Gómez-Herreros *et al.*, 2013).

Während in Hefe noch kein vergleichbares Homolog für TDP2 gefunden werden konnte, ergaben phylogenetische Analysen, dass Pflanzen über drei verschiedene TDP2 Homologe - TDP2 α , TDP2 β und TDP2 γ – verfügen, welche unterschiedlich auf die verschiedenen phylogenetischen Gruppen verteilt sind. Alle Isoformen enthalten die charakteristische C-terminale Endonuklease/Exonuklease/Phosphodiesterase-Domäne, unterscheiden sich aber in ihrem N-Terminus durch das Vorhandensein und die Menge von Zinkfinger-RanBP2-Domänen. Die meisten dikotylen Pflanzen, wie z.B. Arabidopsis, verfügen nur über die TDP2 α -Isoform, welche zwei Domänen vom Zinkfinger-RanBP2-Typ enthält (Confalonieri *et al.*, 2014). Die RanBP2-Domäne gehört zur Klasse der RNA-Bindedomänen, welche in der Lage sind ssDNA zu binden. AtTDP2 könnte dementsprechend eine Funktion in der mRNA-Prozessierung haben (Nguyen *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu HsTDP2 besitzt das pflanzliche Homolog jedoch keine Ubiquitin-assoziierte Domäne (Li *et al.*, 2011). Erste Analysen über die Funktion von TDP2 in Pflanzen erwiesen, dass die Überexpression von TDP2 in *Medicago truncatula* zu einer erhöhten Resistenz gegen osmotischen-, Schwermetall- und Salzstress, sowie zu einer erhöhten Resistenz gegen Eto führt (Confalonieri *et al.*, 2014; Faè *et al.*, 2014; Macovei *et al.*, 2018; Confalonieri *et al.*, 2019). Abseits dieser Überexpressionsanalysen ist über die zelluläre Funktion von TDP2 in Pflanzen allerdings noch nichts bekannt.

1.4 ZIELSETZUNG

Kovalente Quervernetzungen zwischen DNA und Proteinen (*DNA protein crosslinks*, DPCs) stellen eine große Gefahr für die Genomintegrität dar, da sie Chromatin-basierte Prozesse durch ihre Sperrigkeit stark behindern können. Wenn der Schaden vor der replikativen Phase nicht behoben wird, kann dies den Verlust genetischer Informationen, oder sogar den Zelltod zur Folge haben. Erst kürzlich wurden die Hauptreparaturfaktoren von nicht-enzymatischen DPCs und kovalenten Topoisomerase 1 *cleavage complexes* (TOP1cc) in Pflanzen identifiziert. Im Gegensatz dazu ist noch nichts darüber bekannt, wie kovalente Topoisomerase 2 *cleavage complexes* (TOP2cc) in Pflanzen repariert werden. Dabei stellen TOP2cc einen besonders schädlichen DPC Typus dar, da sie mit einem Doppelstrangbruch (DSB) assoziiert sind. In Säugern konnte gezeigt werden, dass die Tyrosyl DNA Phosphodiesterase 2 (TDP2), in der Lage ist, spezifisch die 5'- Phosphodiesterbindung zwischen der Topoisomerase 2 (TOP2) und der DNA aufzulösen. Phylogenetische Analysen zeigten, dass auch Arabidopsis über ein TDP2 Homolog verfügt.

Ziel dieser Arbeit war es, *tdp2* Mutanten durch CRISPR/Cas basierte Mutagenese zu etablieren und diese durch nachfolgende Analysen im Rahmen der reversen Genetik erstmals in Arabidopsis zu charakterisieren. Neben der phänotypischen Analyse sollte diese besonders im Hinblick auf ihre Funktion in der TOP2cc und der TOP1cc Reparatur untersucht werden. Durch Etablierung von Doppelmutanten die sowohl einen Defekt in *TDP2*, als auch einem der bereits bekannten Reparaturfaktoren *TDP1*, *MUS81* oder *WSS1A* aufweisen, sollte TDP2 durch nachfolgende Epistasisanalysen in das pflanzliche DPC-Reparaturnetzwerk eingegliedert werden. Zudem sollte analysiert werden, welche der bereits bekannten Faktoren in die Entfernung von TOP2 involviert sind und wie die jeweiligen Faktoren mit TDP2 in der TOP2cc Reparatur interagieren. Da nach der Entfernung von TOP2 noch ein DSB in der DNA verbleibt, sollten Doppelmutanten mit jeweils einem Defekt in einem TOP2cc Hauptreparaturfaktor und einem weiteren Defekt in entweder dem cNHEJ Faktor *LIG4*, oder dem aNHEJ Faktor *POLQ* generiert werden, um in anschließenden Sensitivitätsanalysen zu untersuchen, wie der jeweilig resultierende DSB, nach der Entfernung von TOP2, repariert wird.

Die Protease *WSS1A* ist ein wichtiger Faktor für die DPC-Reparatur in Pflanzen. Mutanten mit einem Defekt in *WSS1A* wiesen jedoch auch schwere Wachstumsdefizite auf, die auf eine besondere Rolle von *WSS1A* in der Replikation hindeuteten. Durch zytologische Untersuchungen und Epistasisanalysen sollte die Rolle von *WSS1A* in der replikationsassoziierten Schadenstoleranz näher untersucht werden. Hierfür sollten Doppelmutanten mit einem Defekt in *WSS1A* und einem weiteren Defekt in einem der beiden NHEJ-Faktoren *POLQ*, *LIG4* oder der Reparaturhelikase *RECQ4A* generiert und analysiert werden

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Verwendete Organismen

Arabidopsis thaliana

In dieser Arbeit wurden *A. thaliana* Pflanzen des Ökotyps Columbia (Col-0) verwendet. Verwendete Mutantenlinien entstammen den SALK (Alonso *et al.*, 2003) oder GABI-Kat T-DNA Insertions-Kollektionen (Rosso *et al.*, 2003) oder waren zuvor mittels CRISPR/Cas9 vermittelter Mutagenese generiert worden. Die verwendeten Mutantenlinien können Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 2.1: Verwendete Mutantenlinien.

Aufgelistet ist der Genname, der Genlokus und Identifikationsnummer der in dieser Arbeit verwendeten Mutantenlinien. Die T-DNA Insertionsmutanten entstammen den SALK- und GABI-Kat-Kollektionen, die CRISPR/Cas Mutanten wurden institutseigen generiert. Die Referenz bezieht sich auf die Erstcharakterisierung der entsprechenden Mutante.

Gen	Lokus	Mutanten-bezeichnung	Linien-ID	Referenz
<i>LIG4</i>	At5g57160	<i>lig4-5</i>	SALK_095962	Waterworth <i>et al.</i> , 2010
<i>MUS81</i>	At4g30870	<i>mus81-1</i>	GABI_113F11	Hartung <i>et al.</i> , 2006
<i>RECQ4A</i>	At1g10930	<i>recq4A-4</i>	GABI_203C07	Hartung <i>et al.</i> , 2007
<i>RMI1</i>	At5g63540	<i>rmi1-2</i>	SALK_094387	Röhrig <i>et al.</i> , 2016
<i>TDP1</i>	At5g15170	<i>tdp1-4</i>	CRISPR/Cas	Enderle <i>et al.</i> , 2019
<i>TEBICHI</i>	At4g32700	<i>teb-5</i>	SALK_018851	Inagaki <i>et al.</i> , 2006
<i>WSS1A</i>	At1g55915	<i>wss1A-3</i>	CRISPR/Cas	Enderle <i>et al.</i> , 2019

Agrobacterium tumefaciens

Zur Transformation von *Arabidopsis* Pflanzen wurde der *Agrobacterium* Stamm GV3101::pMP90 verwendet, welcher eine chromosomale Rifampicin Resistenz aufweist und durch das modifizierte Ti-Plasmid pTiC58ΔT-DNA über eine zusätzliche Gentamycin Resistenz verfügt (Koncz *et al.*, 1984).

Escherichia coli

Zur Klonierung und zur Vervielfältigung von Plasmiden vor der Transformation in *Agrobacterium*, wurde der *E. coli* Stamm NEB5α (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet. Zur Vermehrung von Gateway Vektoren wurde der Stamm One Shot™ ccdB Survival™ (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) verwendet.

2.1.2 Verwendete Plasmide

pEN-Sa-Chimera (Steinert *et al.*, 2015)

Das pEN-Sa-Chimera Plasmid diente als Eingangsvektor zur Klonierung in *Gateway*-Vektoren. Mittels Überhänge zu zwei BbsI Schnittstellen konnten die entsprechenden DNA-Sequenzen, die für die *single guide* RNA (sgRNA) kodieren, in den zuvor linearisierten Vektor eingebracht werden. Die Chimera-Plasmide verfügen über eine Ampicillin-Resistenz, zur Selektion von erfolgreich transformierten *E. coli* Zellen. Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten pEN-Sa-Chimera-Vektoren aufgelistet.

- pEN-Sa-Chimera TDP2 PS1
- pEN-Sa-Chimera TDP2 PS2

pDE-Sa-EC_PPT

Das pDE-SA-EC_PPT Plasmid diente als Ziel-Vektor für die Gateway-Klonierung. Der Ursprungvektor dieses Plasmids ist das pDE-Sa-Cas9 Plasmid (Steinert *et al.*, 2015), welches durch Carla Schmidt modifiziert wurde. Zur simultanen Induktion von zwei DSB, verfügt der Vektor über zwei Promotoren zur Expression der sgRNA. Der PcUbiquitin4-2-Promotor wurde durch einen EC.1.1-Promotor (Wolter *et al.*, 2018) ausgetauscht, der pea3A-Terminator durch einen rbcS-E9-Terminator und die Kanamycin-Resistenz Kasette durch eine Phosphinotricin (PPT) Resistenz ersetzt. Die PPT-Resistenz dient zur Selektion von transformierten Pflanzen. Zur simultanen Induktion von zwei DSBs, verfügt der Vektor weiterhin über eine Cas9, sowie zwei sgRNA Expressionskassetten. Eine Spectinomycin-Resistenz Kasette diente der Selektion von transformierten Bakterien. Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten pDE-Sa-EC_PPT Vektoren aufgelistet.

- pDE-Sa-EC_PPT TDP2 PS1
- pDE-Sa-EC_PPT TDP2 PS1 + PS2

2.1.3 Verwendete Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) entsalzt bezogen und standardmäßig mit ddH₂O auf eine Konzentration von 50 pmol/μl gebracht. Die Sequenzen können aus Tabelle 8.1 im Anhang entnommen werden.

2.1.4 Enzyme und Enzymmische

- Cellulase aus *Trichoderma* sp. C1794 (Merck, Darmstadt)
- Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)
- Gateway LR Clonase II Enzym-Mix (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- LightCycler480 KAPA HRM FAST Mastermix (VWR International, Darmstadt)
- Proteinase K (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt am Main)
- Pectolyase aus *Aspergillus japonicus* P5936 (Merck, Darmstadt)
- Pectolyase Y-23 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)
- RNase-Free Dnase Set (Qiagen, Hilden)
- T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)

2.1.5 Kits und Verbrauchsmaterialien

- 384 Well LightCycler Platten (Sarstedt, Nümbrecht)
- Adhesive qPCR Seal (Sarstedt, Nümbrecht)
- Elektroporationsküvette 2 mm Elektrodenabstand (VWR International, Darmstadt)
- peqGOLD Cycle-Pure Kit (VWR International, Darmstadt)
- peqGOLD Gel Extraction Kit (VWR International, Darmstadt)
- peqGOLD Plasmid Miniprep Kit (VWR International, Darmstadt)
- qScript cDNA Synthesis Kit (Quanta bio, Beverly, USA)
- Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden)

2.1.6 Chemikalien, Antibiotika und Genotoxine

Alle in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), SERVA Elektrophoresis (Heidelberg), Merck, (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim) oder VWR International (Darmstadt) bezogen und werden nicht gesondert aufgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sonderchemikalien sind im Folgenden aufgelistet.

Sonderchemikalien:

- Acetosyringon (Merck, Darmstadt)
- Agarose SeaKem LE Agarose (Lonza, Basel, Schweiz)
- Benzylaminopurin BAP (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)
- dNTP-Mix Set 10 mM (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)

- Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
- GeneRuler™ 1 kb DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)
- GeneRuler™ *Low Range* DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)
- Murashige & Skoog Fertigmedium (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)
- Orange G (Merck, Darmstadt)
- Plant Agar (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)
- Silwet Gold (Hermann Meyer KG, Rellingen)
- Trypton (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)
- Vectashield Antifade Mounting Medium mit DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol) (Vector Laboratories, Burlingame, USA)

Genotoxine

- Camptothecin (CPT, Merck, Darmstadt) → Stocklösung 20 mM in DMSO
- Etoposid (Eto, Merck, Darmstadt) → Stocklösung 50 mM in DMSO

Antibiotika und Herbizide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Herbizide wurden von den Firmen Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, Niederlande) und Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und sind in folgender Tabelle aufgelistet

Tabelle 2.2: Antibiotika und Herbizide.

Aufgelistet sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika und Herbizide, das Lösungsmittel, die Stocklösung und die benötigte Endkonzentration für die Medien zur Anzucht von *E. coli*, *A. tumefaciens* und *A. thaliana*.

Antibiotikum/ Herbizid	Lösungs- mittel	Stocklösung	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. thaliana</i>
Ampicillin	ddH ₂ O	100 mg/ml	100 mg/l		
Cefotaxim	ddH ₂ O	250 mg/ml			500 mg/l
Gentamycin	ddH ₂ O	100 mg/ml		20 mg/l	
Phosphinotricin	ddH ₂ O	20 mg/ml			6 mg/l
Rifampicin	DMSO	100 mg/ml		100 mg/l	
Spectinomycin	ddH ₂ O	100 mg/ml	100 mg/l	100 mg/l	

2.1.7 Medien, Lösungen und Puffer

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden standardmäßig mit ddH₂O angesetzt. Medien zur Bakterien- und Pflanzenanzucht wurden vor der Verwendung autoklaviert. Vor der Zugabe von Antibiotika und Herbiziden wurden die Medien auf eine Temperatur von weniger als 50 °C heruntergekühlt.

Medien zur Anzucht und Transformation von Pflanzen

GM-Medium (Germination Media) 4,9 g/l Murashige und Skoog Fertigmedium; 10 g/l (zur Anzucht von *A. thaliana*) Saccharose; 7,6 g/l Plant Agar für Festmedien
→ pH 5,7 mit KOH

Infiltrationsmedium 2,5 g/l Murashige und Skoog Fertigmedium; 50 g/l (zur Transformation von *A. thaliana*) Saccharose; 5,25 µl/l Benzylaminopurin [1 mg/ml]
→ pH 5,7 mit KOH
vor Gebrauch wurden 1000 µl/l Acetosyringon [100 mg/ml in DMSO] und 500 µl/l Silwet Gold zugegeben

Medien zur Anzucht von Bakterien

LB-Medium (Lysogeny broth) 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 17,5 g/l Plant (zur Anzucht von *E. coli*) Agar für Festmedien

YEB-Medium (Yeast extract broth) 5 g/l Beefextrakt; 5 g/l Pepton; 1 g/l Hefeextrakt; 5 g/l (zur Anzucht von *A. tumefaciens*) Saccharose; 493 mg/l MgSO₄; 12 g/l Plant Agar für Festmedien

Puffer zur DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial

DNA-Extraktionspuffer 0,2 M Tris-HCl; 0,4 M LiCl; 0,25 M EDTA; 1 % SDS (Shorty-Puffer)
→ pH 9,0 mit HCl

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl; 1,0 mM EDTA
→ pH 8,0 mit HCl

Lösungen und Puffer zur Agarose-Gelelektrophorese

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

20x SB-Puffer 8 g/l NaOH; 47 g/l Borsäure
→ pH 8,0 mit H₃BO₃

0,9 % SB-Agarosegel 0,9 % Agarose; 400 ml 1x SB-Puffer; 15 µl 1 % Ethidiumbromid

<u>50x TAE-Puffer</u>	224 g/l Tris; 57,1 ml/l Eisessig; 0,5 M EDTA → pH 8,0 mit C ₂ H ₄ O ₂
<u>0,9 % TAE-Agarosegel</u>	0,9 % Agarose; 400 ml 1x TAE-Puffer; 15 µl 1 % Ethidiumbromid

Lösungen und Puffer zur Chromatinpräparation

<u>Fixierlösung</u>	75 % Ethanol absolut; 25 % Eisessig
<u>0,01 M Citratpuffer</u>	4,45 ml 0,1 M Natriumcitrat; 5,55 ml 0,1 M Zitronensäure; aufgefüllt mit sterilem ddH ₂ O auf 100 ml → pH 4,5
<u>Verdau-Stocklösung</u>	1 % Cellulase; 1 % Pectolyase gelöst in 0,01 M Citratpuffer

2.1.8 Geräte

Binokulare und Mikroskope

- Binokular Stemi DV4 (Carl Zeiss, Jena)
- Binokular SZB300 (VWR International, Darmstadt)
- Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 700 mit AxioCam HRm (Carl Zeiss, Jena), Filtersatz Cy 3, Filtersatz 49 DAPI, Objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27, Objektiv Plan-Apochromat 100x/1,4 Oil DIC M27

Heizblöcke, Inkubatoren, Rührer und Schüttler

- Anzuchtschrank CU-36L4 (CLF Plant Climatics, Wertingen)
- BOECO TS-100 Thermo Shaker (Boeckel + Co, Hamburg)
- Inkubationsschüttler 3032 (GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel)
- Inkubationsschüttler Ecotron (Infors AG, Bottmingen)
- Magnetrührer H3760-SE (Benchmark Scientific Inc., Sayreville, NJ, USA)
- Magnetrührer MR Hei-Mix S (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Magnetrührer IKAMAG REC-G (IKA-Werke GmbH + Co. KG, Staufen)
- Magnetrührer Rotilabo®-Mini-Magnetrührer M 3 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Thermomixer C, compact und comfort 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
- Trockenschrank Modell UL-50 und Modell UE-500 (Mettler, Schwabach)

Sicherheitswerksbänke und Reinraumbänke

- MaxiSafe 2020 1.5 Class II Biological Safety Cabinets (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)
- Sicherheitswerkbank NU-480-500E (NuAire, Plymouth, USA)

Thermocycler

- LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim)
- MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, München)
- SimliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)
- T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, München)
- TPersonal Thermocycler (Analytik Jena, Jena)

Waagen

- Feinwaage LA164i (VWR International, Darmstadt)
- Feinwaage OHAUS PA214C (OHAUS, Parsippany, USA)
- Präzisionswaage CS-200 (Ohaus Europe GmbH, Nanikon, Schweiz)
- Präzisionswaage KERN 440-47 (Kern & Sohn, Balingen)

Zentrifugen

- MiniSpin Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)
- NeoLab Zentrifuge mit Vortexer 7-0040 (neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg)
- PerfectSpinP Plate Spinner (VWR International, Darmstadt)
- Z 216 M (Hermle Labortechnik, Wehingen)
- Z 233 MK-2 (Hermle Labortechnik, Wehingen)
- Z 383 K (Hermle Labortechnik, Wehingen)

Sonstige Geräte

- Gel iX Imager Geldokumentationssystem (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen)
- FiveEasy pH-Meter (Mettler-Toledo, Gießen)
- NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)
- PURELAB Classic Reinstwasseranlage (ELGA LabWater, Celle)
- VisiCam 5 Plus USB Kamera (VWR International, Darmstadt)

2.1.9 Datenbanken und Software

- ApE - A Plasmid Editor v2.0.49 (M. Wayne Davis, Salt Lake City, Utah, USA)
- Image J 1.48v (National Institutes of Health, USA)
- LightCycler480 Gene Scanning Software 1.5.1 (Roche Diagnostics, Mannheim)
- LightCycler480 Software 1.5.1 (Roche Diagnostics, Mannheim)
- National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- NLS mapper (<http://www.mleg.cse.sc.edu/seqNLS/>)
- SmartRoot4.1 Plugin für Image J (Lobet *et al.*, 2011)
- TAIR - The Arabidopsis Information Ressource (<http://www.arabidopsis.org>)
- ZEN black 2012, ZEN blue 2012 (Carl Zeiss, Jena)

Der letzte Zugriff auf die genannten Datenbanken erfolgte am 30.08.2021

2.2 METHODEN

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) diente der Vervielfältigung ausgewählter DNA-Abschnitte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode angewendet um bestimmte genetische Bereiche zu genotypisieren, für die nachfolgende Sequenzierung zu amplifizieren oder um Transformationsereignisse zu kontrollieren. In dieser Arbeit wurde für die Amplifikation standardmäßig die Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Je nach Fragestellung wurden unterschiedliche große Reaktionsansätze gewählt. Für die Genotypisierung wurden 25 µl Reaktionsansätze gewählt, während für Kolonie-PCRs und für Proben die sequenziert werden sollten 50 µl Volumina gewählt wurden. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des Produkts und die Annealingtemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur (T_m) der Primer, welche mit folgender Formel berechnet werden kann:

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

Zur Visualisierung der erfolgreichen Amplifikation, wurden die Proben, versetzt mit 6x Ladepuffer auf ein Ethidiumbromid-haltiges 0,9 %iges SB-Agarosegel geladen und bei einer Spannung von 120 bis 200 V der Größe nach aufgetrennt. Als Größenmarker diente der 1 kb GeneRuler von Thermo Fisher Scientific. Mittels einer Geldokumentationsstation (Gel iX Imager, Intas Science Imaging Instruments, Göttingen) konnten die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmente anschließend sichtbar gemacht werden.

Die PCR-basierte Genotypisierung

Die PCR-basierte Genotypisierung wurde im Zuge der Linienetablierung angewendet, um zwischen homozygoten, heterozygoten und Wildtyp-Pflanzen (WT) unterscheiden zu können. Als *template* für die PCR diente die mittels schneller DNA-Extraktion isolierte gDNA der zu untersuchenden Pflanzenlinien. Zur Genotypisierung der Mutantenlinien wurde jeweils ein WT- und ein Mutantenspezifisches Primerpaar gewählt, wobei die unterschiedlichen Primerkombinationen und Konditionen in Tabelle 8.1 und 8.2 eingesehen werden können. Zur Identifikation von T-DNA Insertionslinien wurde ein genspezifischer Primer gewählt und ein Primer, der in der *Left-border* der T-DNA bindet. Dementsprechend sollte nur bei homozygoten- oder heterozygoten Mutantenlinien, die die T-DNA Insertion mindestens auf einem Allel aufweisen, ein Amplifikat gebildet werden können. Zur Identifikation ob es sich um eine homo- oder um eine heterozygote Mutantenlinie handelt, wurde zusätzlich eine WT-spezifische PCR durchgeführt. Die WT-spezifischen Primer wurden so gewählt, dass sie links und rechts außerhalb des T-DNA Insertionsbereichs binden. Da sich die Elongationszeit nach der Länge des WT-Produkts richtet und somit nicht für die Amplifikation der T-DNA ausreichen würde, entsteht nur dann ein Amplifikat, wenn mindestens eines der Allele die WT-Sequenz ohne T-DNA Insertion aufweist. Heterozygote Individuen weisen dementsprechend sowohl ein WT als auch ein T-DNA Produkt auf, während homozygote Mutanten nur ein T-DNA Insertionsprodukt und WT-Pflanzen nur ein WT-Produkt aufweisen.

Die Genotypisierung von CRISPR/Cas generierten Mutantenlinien lief nach einem ähnlichen Schema ab. Auch hier wurden WT- und Mutantenspezifische Primerpaare gewählt. Da CRISPR/Cas generierte Mutantenlinien jedoch keine T-DNA enthalten, sondern stattdessen genomische Veränderungen in Form von Insertionen oder Deletionen enthielten, mussten die Primerkombinationen angepasst werden. Für die Identifizierung von mutierten Allelen, wurde ein Primer gewählt der den Mutationsbereich überspannt und die mutierte Sequenz enthielt, sowie ein genspezifischer Primer. Für die Identifikation des WT-Allels wurde auch ein Primer gewählt der den Mutationsbereich überspannt, aber die WT-Sequenz enthielt, sowie ein weiterer genspezifischer Primer. Ebenso wie bei den T-DNA Insertionslinien konnte dadurch zwischen homozygoten, heterozygoten und WT-Pflanzen diskriminiert werden.

Sequenzbasierte Genotypisierung

CRISPR/Cas generierte Mutantenlinien welche nur kleine genomische Veränderungen wie 1 bp Insertionen oder Deletionen aufweisen, eignen sich nicht für die PCR-basierte Genotypisierung da die Sequenzunterschiede zum Wildtyp zu gering sind, als dass mit den ausgewählten Primerpaaren ein WT- oder ein Mutantenspezifisches Produkt generiert werden könnte. Daher wurden für entsprechende Mutantenlinien Primerkombinationen gewählt, die beiderseits des mutierten Bereichs binden und somit ein Produkt gebildet wird, das den mutierten Bereich enthält. Nach der Amplifikation wurden die

entsprechenden PCR-Produkte mittels des peqGOLD Cycle-Pure Kit (VWR International, Darmstadt) aufgereinigt und anschließend sequenziert. Die Genotypisierung erfolgte durch den Vergleich des Chromatogramms der Sanger-Sequenzierung mit der bereits bekannten WT-Sequenz.

Kolonie-PCR

Zur Kontrolle ob ein DNA-Fragment bei der Klonierung erfolgreich in einen Vektor eingebracht wurde, erfolgte nach Transformation des entsprechenden Vektors in Bakterienzellen eine Kolonie-PCR. Für die Amplifikation wurde dabei je ein insertionsspezifischer Primer und ein vektorspezifischer Primer gewählt. Nur wenn das DNA-Fragment erfolgreich in den Vektor eingebracht wurde, konnte ein Produkt gebildet werden. Als *template* diente je eine Bakteriekolonie, deren Zellwand vor der PCR durch 5minütiges Erhitzen bei 95 °C aufgebrochen wurde.

High resolution Melting Analysen

Eine *High Resolution Melting* Analyse (HRM) wurde zur Identifizierung von Mutanten nach Cas9 vermittelter Mutagenese durchgeführt. Das Prinzip der HRM beruht darauf, dass sich durch Mutationen die Schmelztemperatur der DNA im Vergleich zum Wildtyp verändert. Für die Identifizierung potentieller Mutantenlinien wurde daher eine Primerkombination gewählt, bei welcher ein Primer vor und ein Primer hinter der erwarteten Cas9 Schnittstelle binden konnte. Die Gesamtlänge des Amplikons sollte nicht mehr als 200 bp betragen, da die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante sonst weniger deutlich sind. Als *template* diente genomische DNA der potentiellen Mutantenlinien, welche zuvor mittels der schnellen DNA-Extraktion isoliert wurde. Der Reaktionsansatz wurde mit dem KAPA HRM FAST-Mastermix nach Herstellerangaben angesetzt. Im Mastermix ist ein Farbstoff enthalten, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Nach Abschluss der PCR werden die DNA-Amplikons in einer hochauflösende Schmelzkurve denaturiert, wobei die jeweiligen Schmelzpunkte der spezifischen Amplifikate durch die Dissoziation des Farbstoffs gemessen werden können. Die verschiedenen Schmelzkurven wurden anschließend mittels der LightCycler 480 GeneScanning Software analysiert und ausgewertet.

2.2.1.2 Gateway Klonierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gateway Klonierung verwendet, um einen Cas9-Expressionsvektor mit einer spezifischen sgRNA-Sequenz zu erzeugen. Hierfür wurden zunächst die Oligonukleotidsequenzen mit der gewünschten 20 nt langen sgRNA Sequenz mit geeigneten Überhängen für eine BbsI Schnittstelle synthetisiert. Jeweil 100 pmol der zueinander revers komplementären Oligonukleotide wurden im nächsten Schritt miteinander vermengt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend für

20 min bei Raumtemperatur miteinander hybridisiert. Anschließend konnten die hybridisierten Oligonukleotidsequenzen mittels ihrer Überhänge in den zuvor mit BbsI linearisierten pEN-Sa-Chimera Eingangsvektor ligiert werden. Nach Transformation und Vermehrung in *E. coli*, konnte die Sequenz anschließend durch eine Gateway-Reaktion in den pDE-Sa-EC_PPT Zielvektor gebracht werden. Für diese Reaktion wurde der Gateway LR Clonase II Enzyme Mix nach Herstellerangaben verwendet. Nach erneuter Transformation und Vermehrung in *E. coli* konnte der Vektor schließlich in *A. tumefaciens* transformiert und die auf dem Vektor enthaltene T-DNA anschließend durch Agrobakterien-vermittelte Transformation in Pflanzen eingebracht werden.

2.2.1.3 Schnelle DNA-Extraktion aus Pflanzengewebe

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Pflanzen wurde im Rahmen dieser Arbeit standardmäßig die schnelle DNA-Extraktion aus Pflanzengewebe angewandt. Zur Gewinnung des Pflanzenmaterials wurde ein Rosettenblatt der zu untersuchenden Pflanze mit einer Schere abgetrennt und in ein 1,5 ml großes Reaktionsgefäß überführt. Dort wurde es mit einem Pistill zerkleinert und die DNA anschließend durch die Zugabe von 500 µl DNA-Extraktionspuffer aus dem Blattmaterial herausgelöst. Das überschüssige Pflanzenmaterial wurde für 5 min bei 12 000 rpm abzentrifugiert und 400 µl des Überstands wurden in ein neues Gefäß, mit bereits vorgelegten 400 µl Isopropanol, überführt. Durch sorgfältiges Invertieren des Gemischs wurde die DNA gefällt und durch die anschließende Zentrifugation für 10 min bei 14 000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am nächsten Tag in 50-100 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.1.4 RNA-Extraktion aus Pflanzengewebe

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA aus Pflanzen, wurden 100 mg von axenisch angezogenem Pflanzenmaterial in ein 1,5 ml Eppendorf überführt und dann zügig mit einem Pistill zerkleinert. Die RNA-Isolation erfolgte mittels des RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden), gemäß der Herstellerangaben. Der optionale DNaseI Verdau wurde dabei immer durchgeführt. Die RNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

2.2.1.5 cDNA Synthese

Zur Synthese von cDNA aus RNA wurde das qScript cDNA Synthese Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Als *template* wurden 1-3 µg der zuvor isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Nach Abschluss der Synthese, wurde die cDNA mit 180 µl ddH₂O verdünnt und einer Qualitätskontrolle unterzogen. Diese erfolgte mittels einer PCR auf das Haushaltgen *AKTIN2*, da von diesem eine hohe Abundanz an

Transkripten vorhanden sein sollte. Das Amplikon umfasst ein Intron, weshalb potentielle Verunreinigungen genomischer DNA durch die Fragmentgröße detektiert werden können. Die Sequenzen der Primer, die für die Qualitätskontrolle verwendet wurden können Tabelle 8.4. entnommen werden.

2.2.1.6 Restriktionsverdau von Plasmid DNA

Zur Kontrolle von Plasmid-DNA nach den einzelnen Klonierungsschritten, oder auch zur Linearisierung von Plasmiden zum Einbringen von Fremd-DNA, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Die jeweiligen Restriktionsenzyme wurden gemäß der Herstellerangaben verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte für 2 – 3 h bei 37 °C: Zur Kontrolle des Restriktionverdaus, wurde dieser auf ein 0,9 %iges TAE Gel geladen und für circa 30 min bei 120 V der Größe nach aufgetrennt. Die verschiedenen Fragmentgrößen wurden anschließend mit dem erwarteten Bandenmuster verglichen.

2.2.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten zur Sequenzierung wurde das peqGOLD Cycle-Pure Kit (VWR International, Darmstadt) gemäß der Herstellerangaben verwendet. Um zu gewährleisten, dass genug DNA zur Sequenzierung zur Verfügung steht, wurden stets zwei 50 µl PCR-Ansätze in einem Gefäß aufgereinigt und anschließend in 30 µl ddH₂O eluiert.

2.2.1.8 Ligation

Für die Ligation von Plasmiden wurde stets die T4-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.1.9 Sequenzierung

Zur exakten Bestimmung einer DNA-Sequenz, wurden zuvor aufgereinigte DNA-Amplifikate und Plasmide mittels Sanger-Sequenzierung durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) sequenziert. Die ermittelten Sequenzen wurden anschließend mithilfe der Software ApE ausgewertet.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* erfolgte mittels Hitzeschock. Dafür wurden die bei -80 °C gelagerten *E. coli* Zellen zunächst für ca. 10 min auf Eis aufgetaut und danach 1 µl DNA, oder 5 µl eines Ligationsansatzes zugegeben und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Zur Regeneration und Vermehrung der Zellen, wurden diese mit 800 µl flüssigem LB-Medium versetzt und dann für 1 h bei 37 °C und 550 rpm inkubiert. Anschließend wurden ca. 150 µl der Bakterienkultur auf eine LB-Platte, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Transformierte Zellen konnten durch die eingebrachte Antibiotikaresistenz auf den Platten wachsen und waren somit am nächsten Tag als Kolonie sichtbar.

2.2.2.2 Transformation von *A. tumefaciens*

Die Transformation von *A. tumefaciens* Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Dafür wurden zunächst bei -80 °C gelagerte elektrokompente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden je 50 µl elektrokompente *E. coli* in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und dann mit 1 µl Plasmid-DNA vorsichtig vermischt. Die Elektroporation erfolgte im GenePulser II bei einer Spannung von 2500 V, 25 µF Kapazität, 200 Ω Widerstand und einer Pulsdauer von 5 ms. Nach der Elektroporation wurde die Küvette wieder auf Eis gekühlt und die Zellen in 800 µl YEB Medium resuspendiert. Nach Übertragung in ein 1,5 ml großes Reaktionsgefäß, wurden die Agrobakterien für 2 h bei 28 °C und 550 rpm schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Agrobakteriensuspension auf eine YEB-Platte, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

2.2.2.3 Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* Zellen

Zur Isolation von Plasmid DNA wurden zunächst Übernachtskulturen hergestellt. Hierfür wurde die gewünschte Bakterienkolonie mittels einer 10 µl Pipettenspitze in 5 ml flüssiges LB-Medium, versetzt mit Antibiotika, übertragen und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Plasmidisolation mithilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kits (VWR International, Darmstadt) gemäß der Herstellerangaben. Die isolierte Plasmid-DNA wurde abschließend in 50 µl ddH₂O eluiert.

2.2.3 Pflanzenspezifische Methoden

2.2.3.1 Pflanzenanzucht und Samenlagerung

Anzucht im S1-Gewächshaus

Für Phänotypisierungen, Fertilitätsanalysen, Kreuzungen oder Transformationen wurde Arabidopsis Saatgut über Nacht bei 4 °C stratifiziert und am nächsten Tag in Erde mit einer 1:1-Mischung aus Floraton (Floragard) und Vermiculite (2 bis 3 mm, Deutsche Vermiculite Dämmstoff) ausgesät und im S1-Gewächshaus kultiviert. Die Anzucht erfolgte bei einer Temperatur von 22 °C und einem Lichtzyklus mit 16 h Licht (Phillips, Master, TL-D 36W/840) und 8 h Dunkelheit.

Anzucht im Pflanzenanzuchtschrank

Für Genotypisierungen, Sensitivitätsassays und Wurzelassays wurden die Pflanzen stets in einem Pflanzenanzuchtschrank des Modells CU-36L4 angezogen, da dieser für stabile und reproduzierbare Bedingungen sorgt. Vor der Anzucht im Pflanzenanzuchtschrank wurden die Samen sterilisiert (Abschnitt 2.2.3.2), über Nacht bei 4 °C stratifiziert und am nächsten Tag auf festem GM-Medium ausgesät. Der Pflanzenanzuchtschrank war auf einen Tag/Nacht-Rhythmus von 16 h Licht bei 22 °C und 8 h Dunkelheit bei 20 °C eingestellt.

Anzucht im Pflanzenanzuchtraum

Für die Etablierung von CRISPR/Cas generierten Mutantenlinien, wurden Pflanzen im Pflanzenanzuchtraum angezogen. Das Saatgut wurde vor der Aussaat oberflächensterilisiert und über Nacht bei 4 °C stratifiziert. Am nächsten Tag wurden die Samen auf festem GM-Medium, versetzt mit Selektionsantibiotika, ausgesät und im Pflanzenanzuchtraum bei einer Temperatur von 23 °C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit, kultiviert

Lagerung von Saatgut

Die Lagerung von Arabidopsis Saatgut erfolgte bei Raumtemperatur an einem dunklen und trockenen Ort.

2.2.3.2 Oberflächensterilisation von Arabidopsis-Saatgut

Für die axenische Anzucht von Arabidopsispflanzen, wurde das Saatgut zunächst oberflächensterilisiert. Dafür wurden die Samen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 500 µl einer frisch angesetzten 4%igen Natriumhypochlorid-Lösung (Stocklösung 12 %) für 6 min schüttelnd inkubiert. Nach einem

Zentrifugationsschritt für 10 s bei 500 rpm, wurde die Natriumhypochlorid-Lösung abgenommen und die Samen dreimal mit je 500 µl sterilem ddH₂O gewaschen. Zum Schutz des Saatguts vor weiteren Kontaminationen, wurden alle Schritte unter der Sterilbank durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Samen über Nacht bei 4 °C in ddH₂O stratifiziert.

2.2.3.3 Agrobakterien-vermittelte Transformation von Arabidopsis

Zur stabilen Transformation von Arabidopsis Pflanzen, wurde die *Floral Dip* Methode angewandt (Clough & Bent, 1998). Hierfür wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt, bestehend aus 50 ml YEB-Medium mit Antibiotika und angeimpft mit der gewünschten Bakterienkolonie. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 28 °C bei 200 rpm schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur hergestellt. Hierfür wurden 150 µl der Vorkultur in 400 ml YEB-Medium, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, übertragen. Die Hauptkultur wurde für eine Nacht bei 28 °C bei 200 rpm schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden die dicht angewachsenen Agrobakterien für 15 min bei 4000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Agrobakterien in 800 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Vor der Transformation wurden die ca. 4 Wochen alten Arabidopsis Pflanzen von allen Schoten und bereits geöffneten Blüten befreit. Die Transformation erfolgte durch 30-sekündiges eintauchen des Blütenstands in das mit Agrobakterien versetzte Infiltrationsmedium, unter stetigem Rühren. Anschließend wurden die Pflanzen dunkel und feucht über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Pflanzen großzügig mit Leitungswasser abgesprüht und bis zur Ernte im S1-Gewächshaus kultiviert.

2.2.3.4 Etablierung von Mutantenlinien nach Cas9 vermittelter Mutagenese

Mutantenlinien die durch CRISPR/Cas9 generiert wurden, sollten für die weitere Analyse eine homozygote Mutation im Zielgen aufweisen, aber über kein Transgen (Cas9) mehr verfügen. Dafür mussten die potentiellen Mutantenlinien in mehreren Generationen untersucht und genotypisiert werden. Als Selektionsmarker für erfolgreich transformierte Pflanzen, diente eine PPT-Resistenzkassette.

Identifikation von Primärtransformanden (T1-Generation)

Zur Identifikation von erfolgreich transformierten Arabidopsis-Individuen, wurde oberflächensterilisiertes, stratifiziertes Saatgut auf großen GM-Platten, versetzt mit PPT und Cefotaxim ausgebracht. PPT diente als Selektionsmarker für die erfolgreich transformierten Pflanzen, während Cefotaxim dazu diente, die auf der Samenoberfläche vorhandenen Agrobakterien abzutöten. Die Pflanzen wurden für 2 Wochen im Anzuchtraum kultiviert. Anschließend konnten angewachsene

Keimlinge auf frisches GM-Medium, ohne Antibiotika, transferiert und im S1-Gewächshaus weiter kultiviert werden.

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

Zur Identifikation von Individuen, welche mindestens auf einem Allel des Zielgens eine Mutation aufweisen, wurde zunächst nach Linien selektiert, die die T-DNA nur einmal integriert hatten. Hierfür wurden 52 Samen pro Linie nach der Oberflächensterilisation und Stratifikation auf je einer normalen GM-Platte und auf einer GM-Platte, versetzt mit dem Selektionsmarker PPT, ausgesät und für 2 Wochen im Anzuchtraum kultiviert. Linien, die die T-DNA nur an einem Locus integriert haben, sollten gemäß der Mendel'schen Segregation in einem 1:2:1-Verhältnis ($\frac{1}{4}$ homozygot, $\frac{1}{2}$ heterozygot, $\frac{1}{4}$ WT) aufspalten. Durch die auf der T-DNA vorhandene Resistenz gegenüber PPT, sollten deshalb bei einfacher Integration 75 % lebende und 25 % tote Keimlinge vorhanden sein. Das Segregationsverhalten wurde je Platte ausgezählt und mit einem χ^2 -Test statistisch überprüft. Von je 40 Keimlingen der identifizierten *single-locus* Linien, wurde anschließend die DNA von den auf den GM-Platten ohne PPT kultivierten Pflanzen, isoliert und in einer HRM auf Mutationen untersucht. Individuen deren Schmelzkurve sich von der des WTs unterschied, wurden mittels Sanger-Sequenzierung genauer untersucht. Falls eine Mutation in mindestens einem Allel vorlag, wurden die Pflanzen im S1-Gewächshaus bis zur Samenreife weiter kultiviert.

Identifikation transgenfreier homozygoter Mutantenlinien (T3-Generation)

Zur Identifikation transgenfreier Linien, wurden je 52 Samen der Mutantenlinien nach Oberflächensterilisation und Kältestratifikation auf GM-Medium, versetzt mit dem Selektionsmarker PPT, ausgesät und für 2 Wochen im Anzuchtraum kultiviert. Pflanzen welche über kein Transgen mehr verfügen, sollten auf diesem Medium durch die fehlende Resistenz nicht mehr wachsen können. Transgenfreie Linien wurden anschließend auf GM-Medium ohne Selektionsmarker ausgesät. Anschließend wurde von je 40 Keimlingen jeder transgenfreien Linie die DNA isoliert und in einer HRM überprüft. Pflanzen die sich in ihrer Schmelzkurve vom WT unterschieden, wurden durch Sanger-Sequenzierung genauer analysiert. Individuen mit einer homozygoten Mutation wurden anschließend im S1-Gewächshaus durch Selbstbestäubung weitervermehrt. Konnte keine homozygote Mutante gefunden werden, wurden transgenfreie heterozygote Mutantenlinien weitervermehrt und in der darauffolgenden Generation auf homozygote Individuen untersucht. Wenn dagegen alle potentiellen Mutantenlinien der T3-Generation noch über das Transgen verfügten, wurden Linien die das Transgen nur heterozygot integriert hatten durch eine PCR (Primersequenz und Primerkombination in Tabelle 8.4) auf das Transgen untersucht. Pflanzen die kein Amplifikat aufwiesen wurden mittels HRM auf eine homozygote Mutation weiteruntersucht. Die dabei identifizierten homo- und heterozygoten Individuen

wurden im Gewächshaus bis zur Samenreife weiter untersucht und in der T4-Generation durch Aussaat auf Selektionsmedium und Sanger-Sequenzierung nochmals auf Abwesenheit des Transgens überprüft.

2.2.3.5 Etablierung von Doppelmutanten durch Kreuzungen

Zur Generierung von Doppelmutanten wurden zwei bereits bestehende Einzelmutanten im Gewächshaus kultiviert und anschließend miteinander gekreuzt. Hierfür wurden Fruchtknoten von ungeöffneten Knospen der Mutterpflanze, durch Entfernung der Kelch-, Kron-, und Staubblätter mittels einer Pinzette freipräpariert. Anschließend wurde der Fruchtknoten mit einem Staubblatt einer geöffneten Blüte der Vaterpflanze vorsichtig bestäubt, bis sich genug Pollen auf der Narbe des Fruchtknotens befanden. Die künstlich bestäubten Fruchtknoten wurden markiert und die Pflanzen bis zur Samenreife im Gewächshaus weiter kultiviert. Nachwachsende Triebe wurden dabei stets entfernt. Nach etwa 2 Wochen wurden die Schoten geerntet, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 Tage bei 37 °C getrocknet. Der Kreuzungserfolg wurde nachfolgend in der F1-Generation mittels PCR-basierter Genotypisierung verifiziert und die Pflanzen zur weiteren Vermehrung im S1-Gewächshaus kultiviert. In der F2-Generation wurden mindestens 40 Individuen auf homozygote Träger beider Mutationen untersucht, welche gemäß der Mendel'schen Segregation mit einer Wahrscheinlichkeit von 1/16 zu finden sein sollten. Identifizierte Individuen wurden im S1-Gewächshaus weiter vermehrt und das gewonnene Saatgut wurde in der darauffolgenden Generation nochmal überprüft.

2.2.3.6 Chromatinpräparation

Zur zytologischen Untersuchung somatischer Anaphasen wurden Chromatinpräparationen aus Blütenständen durchgeführt (Armstrong *et al.*, 2009). Nach etwa 4 Wochen Anzucht im S1-Gewächshaus, wurden hierfür die Primärblütenstände mehrerer Pflanzen einer Linie in ein Gefäß mit frisch angesetzter Fixierlösung überführt und für ca. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fixierlösung wurde anschließend ausgetauscht, bis die Blütenstände vollständig entfärbt waren. Fixierte Blütenstände konnten bei -20 °C aufbewahrt werden. Zur Präparation von Chromatin, wurden je 3 Blütenstände in einen Färbenapf mit frischer Fixierlösung überführt, und alle bereits geöffneten Blüten, sowie Blüten mit bereits sichtbaren Pollen, entfernt. Von den übrig geblieben Knospen wurden sorgfältig alle Stängel abgetrennt. Anschließend wurde die Fixierlösung entfernt und die freigelegten Knospen zweimal mit 0,01 M Citratpuffer für je 5 min gewaschen. Danach wurden die Knospen in 1 ml Verdaulösung (333 µl Stockverdaulösung mit 667 µl 0,01 M Citratpuffer) bei 37 °C für 75 min inkubiert. Nach Abnahme der Verdaulösung wurde der Verdau durch die Zugabe von eiskaltem ddH₂O gestoppt. Je 3-4 Knospen gleicher Größe wurden mittels einer Pasteurpipette auf einen Objektträger überführt und überschüssiges Wasser wurde mithilfe eines Haushaltstuchs aufgesaugt. Anschließend wurden die Knospen mittels eines abgerundeten Messingstabs so lange zerquetscht, bis keine einzelnen Bestandteile mehr sichtbar

waren. Nach Zugabe von 10 µl 60%iger Essigsäure wurde das Zellhomogenisat sorgfältig mit einer flexiblen Präpariernadel vermischt und in einem etwa 1 cm großen Tropfen ausgebreitet. Der Objektträger wurde anschließend für 30 s auf eine 42 °C warme Heizplatte gelegt. Nachfolgend wurde der Objektträger zweimal vorsichtig mit frisch angesetzter Fixierlösung abgespült und dann, durch Föhnen der Rückseite des Objektträgers, getrocknet. An der Stelle des Tropfens war nun ein getrockneter Ring bestehend aus Zellmaterial sichtbar. Zur Färbung der DNA, wurden 10 µl DAPI in die Mitte dieses Rings pipettiert und dann ein Deckglas aufgelegt. Die Objektträger konnten entweder direkt mittels eines des LSM 700 Fluoreszenzmikroskops untersucht werden oder bei 4 °C gelagert werden.

2.2.3.7 Fertilitätsanalyse

Zur Analyse der Fertilität wurden Arabidopsis Pflanzen für etwa 8 Wochen im S1-Gewächshaus kultiviert. Kurz vor der Samenreife wurden je Genotyp von 5 Pflanzen je 5 reife, aber noch gelbliche Schoten in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 750 µl 70%igen Ethanol überführt und über Nacht inkubiert. Das Ethanol entfärbte die Schoten, wodurch die Samen im Inneren sichtbar wurden. Mithilfe eines Binokulars wurde die Samenanzahl pro Schote ermittelt.

2.2.3.8 Wurzellängenanalyse

Zur Bestimmung der Wurzellänge verschiedener Mutantenlinien, wurde oberflächensterilisiertes, stratifiziertes Saatgut auf quadratischen Platten mit GM-Festmedium (1 % Agar) ausgesät, mit Parafilm versiegelt und für 9 Tage in einem Pflanzenanzuchtsschrank vertikal inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit den gekeimten Wurzeln auf schwarzem Hintergrund, mit einem Lineal als Größenmaßstab, fotografiert. Die Auswertung der Wurzellänge erfolgte mithilfe des SmartRoot Plugins von ImageJ (Lobet et al., 2011). Dabei wurden in mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen je 10 Wurzeln pro Genotyp untersucht.

2.2.3.9 Analyse von Zelltod in Wurzelspitzen

Zur Untersuchung der Sensitivität gegenüber Etoposid (Eto) wurde die Anzahl an toten Zellen in den Wurzelspitzen verschiedener Mutantenlinien unbehandelt und nach der Behandlung mit Eto ermittelt. Dafür wurden die Wurzeln mit Propidiumiodid (PI) angefärbt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der die intakte Membran von lebenden Zellen nicht durchdringen kann und somit selektiv in die DNA von toten Zellen interkaliert. Zur Anzucht der Wurzeln, wurde oberflächensterilisiertes, stratifiziertes Saatgut auf quadratischen Platten mit GM-Festmedium (1 % Agar) ausgesät und dann in aufrechter Position in

einem Pflanzenanzuchtschrank für 4 Tage inkubiert. Für die Behandlung mit Eto, wurden je 15 Keimlinge anschließend in eine 6-Well Platte mit je 4 ml GM-Flüssigmedium transferiert. Dann wurde 1 ml der Eto-Lösung, verdünnt in GM-Flüssigmedium, zugegeben, um eine Endkonzentration von 20 μM zu erhalten (Stocklösung 50 mM, in DMSO). Da manche Mutantenlinien schon im unbehandelten Zustand eine erhöhte Anzahl an toten Zellen in der Wurzelspitze aufweisen, wurden zum Vergleich unbehandelte Wurzeln analysiert, welche direkt in 5 ml GM-Flüssigmedium transferiert wurden. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation im Pflanzenanzuchtschrank, wurden je 10 behandelte und 10 unbehandelte Wurzeln pro Genotyp zunächst mit ddH₂O gewaschen und dann auf einen Objektträger mit 130 μl PI-Lösung (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gelegt. Mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM 700 Laser-Scanning-Mikroskop, Carl Zeiss Microscopy) wurden die toten Zellen im Wurzelmeristem in den vorderen 200 μm der Wurzelspitze, gezählt. Der Versuch wurde in mindestens drei separaten Versuchsansätzen wiederholt. Zum Vergleich der Sensitivitäten wurden jeweils die verschiedenen Genotypen untereinander verglichen, getrennt in behandelt und unbehandelt, sowie der jeweilige Genotyp vor und nach der Behandlung mit Eto.

2.2.3.10 CPT-Sensitivitätsanalyse

Zur Analyse der Sensitivität gegenüber CPT, wurde das Frischgewicht verschiedener Mutantenlinien nach der Genotoxin-Behandlung im Vergleich zu Wildtyp untersucht. Hierfür wurde zunächst oberflächensterilisiertes, stratifiziertes Saatgut auf GM-Festmedium (0,73 % Agar) ausgesät und für 1 Woche in einem Pflanzenanzuchtschrank inkubiert. Pro Vertiefung einer 6-Well Platte wurden 4 ml GM-Flüssigmedium vorgelegt, in welches dann je 10 Keimlinge desselben Genotyps transferiert wurden. Nach einem weiteren Tag Inkubation im Pflanzenanzuchtschrank wurde je 1 ml mit Flüssig-GM verdünnter CPT-Lösung (Stocklösung 20 mM, gelöst in DMSO) entsprechend der gewünschten Endkonzentration (150 nM, 300 nM, 600 nM und 1500 nM) zugegeben. In zwei der sechs Vertiefungen, wurde kein Genotoxin zugeben, damit das relative Frischgewicht anhand des Ursprungsgewichts der einzelnen Mutantenlinien ermittelt werden konnte. Stattdessen wurde 1 ml GM-Flüssigmedium, versetzt mit der Menge an DMSO, die in der Vertiefung mit der höchsten CPT-Konzentration enthalten war, zu den Kontrollpflanzen gegeben. Die Pflanzen wurden für weitere 13 Tage im Pflanzenanzuchtschrank inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen mit einem Papiertuch trockengetupft und dann das Frischgewicht mit einer Feinwaage bestimmt. Das relative Frischgewicht der behandelten Pflanzen wurde anhand des Mittelwerts der beiden unbehandelten Kontrollen berechnet. Der Versuch wurde in mindestens drei separaten Versuchsansätzen wiederholt.

2.2.3.11 Embryoanalyse

Zur Analyse der Vitalität von Arabidopsis-Embryonen, wurden Arabidopsis-Pflanzen für etwa 6-8 Wochen im S1-Gewächshaus kultiviert. Anschließend wurden von etwa 3 Individuen jedes Genotyps insgesamt 5 - 10 frische, große, noch unreife Schoten abgenommen. Diese wurden mit einer Kanüle geöffnet und alle darin befindlichen Samen wurden auf ein weißes Tuch extrahiert. Alle Samen einer Schote wurden mithilfe eines Binokulars ausgezählt, wobei zwischen bräunlichen/defekten und grünen/gesunden Embryonen unterschieden wurde

3. ERGEBNISSE

3.1 ETABLIERUNG UND ANALYSE VON *TDP2* MUTANTEN IN *ARABIDOPSIS*

Topoisomerasen sind essentielle Enzyme in allen Lebewesen, die den korrekten Ablauf von Transkription, Replikation oder Rekombination gewährleisten, indem sie die DNA, durch das Einführen von transienten Schnitten, entwirren und zugänglich machen. Durch verschiedenste Faktoren, kann es aber zu einer abortiven Reaktion der Topoisomerase kommen, bei der die Topoisomerase durch die Phosphodiesterbindung des Reaktionsintermediats kovalent mit der DNA verknüpft bleibt und somit einen enzymatischen DNA-Protein *crosslink* (DPC) in Form eines kovalenten Topoisomerase *cleavage complex* (TOPcc) bildet (Ide *et al.*, 2018). Während die Reparatur von TOP1cc in Pflanzen bereits genauer analysiert wurde, ist dagegen noch nicht bekannt, welche Faktoren zur Reparatur von TOP2cc in Pflanzen beitragen (Enderle *et al.*, 2019; Hacker *et al.*, 2020). TOP2cc unterscheiden sich biochemisch von TOP1cc, da die Topoisomerase 2 (TOP2) mit den 5'-Enden eines DSB assoziiert ist, während die Topoisomerase 1 über das 3'-Ende eines Einzelstrangbruchs mit der DNA verknüpft ist (Wang, 1996; Pommier *et al.*, 2014). Durch diese unterschiedlichen Eigenschaften bedarf es wahrscheinlich auch unterschiedlicher Reparaturmechanismen. Im Gegensatz zu Pflanzen, wurde die Reparatur von TOP2cc in Säugern bereits genauer untersucht. Hierbei konnte ein spezifisches Enzym identifiziert werden – die Tyrosyl DNA Phosphodiesterase 2 (TDP2) – welches an der Reparatur von TOP2cc in Säugern beteiligt ist (Cortes Ledesma *et al.*, 2009). Da bisher noch relativ wenig über die zelluläre Funktion des pflanzlichen Homologs bekannt ist, sollte AtTDP2 im Rahmen dieser Arbeit funktionell charakterisiert werden.

3.1.1 CRISPR/Cas9 vermittelte Mutagenese von *TDP2*

Zur Charakterisierung von TDP2 in Pflanzen wurde eine zielgerichtete Mutagenese mittels des CRISPR/Cas Systems in At*TDP2* durchgeführt. Der Mechanismus beruht auf der zielgerichteten Induktion eines DSB durch die Nuklease Cas9, welcher im Folgenden durch den fehleranfälligen Weg des NHEJ, dem Hauptmechanismus der DSB Reparatur in Pflanzen, repariert wird. Dabei kann es zu Fehlern in Form von Insertionen oder Deletionen kommen, die das Leseraster des Gens beeinträchtigen können. In dieser Arbeit wurde das Cas9-Ortholog von *S. aureus* verwendet (Steinert *et al.*, 2015). Um möglichst sicher eine *loss of function* Mutation in *TDP2* zu erzeugen, wurde ein *multiplexing* Ansatz verwendet, bei dem durch die simultane Induktion von zwei DSB in *TDP2* ein großes Stück aus dem Gen deletiert werden sollte. Hierfür wurden in zwei unterschiedlichen Ansätzen je zwei Schnittstellen (*protospacer*), eine vor und eine nach der funktionellen Endonuklease/Exonuklease/Phosphatase Domäne, in einer Entfernung von etwa 1 kb, gewählt. Die *spacer* Sequenzen für die Klonierung in den Entry Vektor sind Tabelle 8.3 aus dem Anhang zu entnehmen. Die anhand der *protospacer* designten *spacer* Sequenzen wurden je in einen pEN-Sa-Chimera Entry-Vektor kloniert. Der erste *spacer* konnte

anschließend mittels Restriktionsverdau und Ligation in den pDE-Sa-EC_PPT Vektor kloniert werden. Der zweite *spacer* wurde dann über eine Gateway Reaktion in den Destination Vektor, der bereits die erste *spacer* Sequenz enthielt, eingebracht. Der pDE-Sa-EC_PPT Vektor enthält eine Kassetten für das Cas9-Protein, sowie zwei Promotoren für die zwei sgRNAs, durch welche die Cas9 Nuklease an beiden ausgewählten Stellen in *TDP2* schneiden können sollte. Die Cas9-Expressionkassetten (pDE-Sa-EC_PPT PS1+PS2 und pDE-Sa-EC_PPT PS3+PS4) wurden zunächst in *A. tumefaciens* transformiert und dann durch die Agrobakterien vermittelte Transformation in Arabidopsis Pflanzen eingebracht (Abschnitt 2.2.3.3). Für die schnellere Etablierung von Doppelmutanten, wurden die Konstrukte nicht nur in Wildtyp Arabidopsis Pflanzen, sondern auch in *wss1A-3* und *tdp1-4* Mutanten transformiert. Die T1-Generationen wurde nach erfolgreich transformierten Pflanzen selektiert und in den T2-Generationen auf *single-locus* Linien überprüft (Abschnitt 2.2.3.4). Identifizierte *single locus* Linien wurden mit einer PCR auf Deletionen im *TDP2*-Gen untersucht (Abschnitt 2.2.1.1). Mutanten mit der gewünschten Deletion, sollten eine geringere Fragmentgröße aufweisen als der Wildtyp, und heterozygote Mutanten sollten dementsprechend nach der Gelelektrophorese eine Doppelbande aufweisen. Da in der PCR keine Deletionsmutanten identifiziert werden konnten, wurden die Linien mittels HRM bezüglich der einzelnen Schnittstellen, weiteranalysiert. Die Oligonukleotidsequenzen zur Etablierung von *tdp2* Mutanten sind Tabelle 8.4 im Anhang zu entnehmen. Durch die Schmelzkurven bei der HRM wurde ersichtlich, dass die Cas9-Nuklease nur in PS1 erfolgreich schneiden konnte. Linien, die eine sich vom Wildtyp unterscheidende Schmelzkurve aufwiesen, wurden mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Linien, bei denen dabei hetero- oder homozygote Mutationen am PS1 detektiert werden konnten, wurden weitervermehrt. Da PS1 (Position 320 nach dem Startcodon) in Exon 1 zwar nach den zwei Zinkfinger RanBP2-Domänen, aber noch vor der potentiellen Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization signal*, NLS) und vor der funktionellen Endonuklease/Exonuklease/Phosphatase-Domäne lokalisiert, erschienen *frameshift* erzeugende Mutationen an dieser Stelle als geeignet genug um eine *loss of function* Mutation in *TDP2* zu erzeugen (Abbildung 3.1).

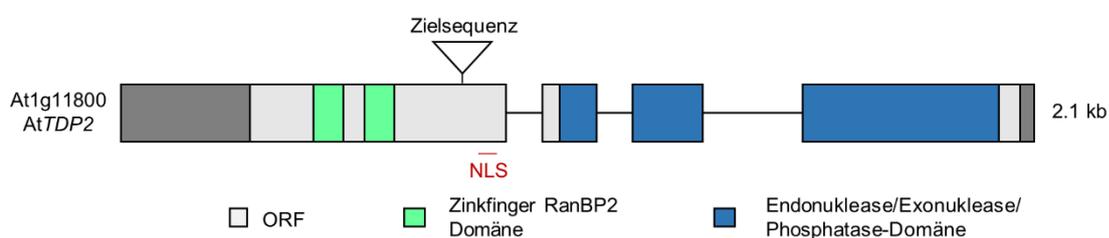


Abbildung 3.1: Gen- und Domänenstruktur von *AtTDP2*

Dargestellt ist die Struktur des *TDP2* Gens mit Domänen. Das Gen hat eine Länge von 2,1 kb und besteht aus 4 Exons (Kästen) und 3 Introns (Linien). Die beiden Zinkfinger RanBP2-Domänen befinden sich im ersten Exon und die funktionelle Endonuklease/Exonuklease/Phosphatase-Domäne erstreckt sich über Exon 2, 3 und 4. Das Dreieck zeigt auf die Zielsequenz (Protospacer) für die erfolgreiche Cas9 vermittelte Doppelstrangbruch (DSB) Induktion. Die 3'- und die 5'-untranslatierten Regionen sind dunkelgrau eingefärbt und der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) ist hellgrau eingefärbt.

In der T3 Generation wurde nach transgenfreien Linien selektiert und homozygot mutierte Linien weiteretabliert. Nach erneuter Überprüfung der Linien in der T4-Generation, wurden stabile Mutantenlinien weitervermehrt. Im Wildtyp-Hintergrund konnte hierbei eine *tdp2* Mutante mit einer 5 bp Deletion an Position 332 nach dem Startcodon (*tdp2-1*), sowie eine Mutante mit einer 1 bp Insertion (A) an Position 337 (*tdp2-2*) generiert werden. Die identifizierte homozygote Mutation von *TDP2* im *tdp1-4* Hintergrund war ebenfalls eine 1 bp Insertion (A) an Position 337 (*tdp2-3*). Im *wss1A-3* Hintergrund konnte eine 1 bp Deletion an Position 338 in *TDP2* homozygot (*tdp2-4*) etabliert werden. All diese Mutationen führen zu einer Verschiebung des Leserasters und bewirken einen verfrühten Translationsstop, wodurch nur ein kleiner Teil des Proteins synthetisiert werden kann. Die induzierten Mutationen wurden nachfolgend auch auf mRNA Ebene untersucht. Hierfür wurde zunächst die Gesamt-RNA der einzelnen Mutanten isoliert, dann in cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert und sequenziert. Die einzelnen Mutationen konnten dabei alle auch auf cDNA-Ebene nachgewiesen werden (Abbildung 3.2).

WT	1	ATGTCACAACAACATCCGATTTCTGAGAATTGTACAAAGTCGAGCAATGTCGTCGCTTTGGTCCTGCAACAAATGTACTTTCCCTCAATTCTGCGTCTCAG	99
<i>tdp2-1</i>		ATGTCACAACAACATCCGATTTCTGAGAATTGTACAAAGTCGAGCAATGTCGTCGCTTTGGTCCTGCAACAAATGTACTTTCCCTCAATTCTGCGTCTCAG	
<i>tdp2-2</i>		ATGTCACAACAACATCCGATTTCTGAGAATTGTACAAAGTCGAGCAATGTCGTCGCTTTGGTCCTGCAACAAATGTACTTTCCCTCAATTCTGCGTCTCAG	
<i>tdp2-3</i>		ATGTCACAACAACATCCGATTTCTGAGAATTGTACAAAGTCGAGCAATGTCGTCGCTTTGGTCCTGCAACAAATGTACTTTCCCTCAATTCTGCGTCTCAG	
<i>tdp2-4</i>		ATGTCACAACAACATCCGATTTCTGAGAATTGTACAAAGTCGAGCAATGTCGTCGCTTTGGTCCTGCAACAAATGTACTTTCCCTCAATTCTGCGTCTCAG	
WT	100	AAACTCAATTGCATGATCTGCTTGGCTCCTGTATCTCTCCCTCTTTGTCTCCTCCACCTTCTCTCAATTTCCGGGAACGATGAAGCTAAATGG	198
<i>tdp2-1</i>		AAACTCAATTGCATGATCTGCTTGGCTCCTGTATCTCTCCCTCTTTGTCTCCTCCACCTTCTCTCAATTTCCGGGAACGATGAAGCTAAATGG	
<i>tdp2-2</i>		AAACTCAATTGCATGATCTGCTTGGCTCCTGTATCTCTCCCTCTTTGTCTCCTCCACCTTCTCTCAATTTCCGGGAACGATGAAGCTAAATGG	
<i>tdp2-3</i>		AAACTCAATTGCATGATCTGCTTGGCTCCTGTATCTCTCCCTCTTTGTCTCCTCCACCTTCTCTCAATTTCCGGGAACGATGAAGCTAAATGG	
<i>tdp2-4</i>		AAACTCAATTGCATGATCTGCTTGGCTCCTGTATCTCTCCCTCTTTGTCTCCTCCACCTTCTCTCAATTTCCGGGAACGATGAAGCTAAATGG	
WT	199	GCTTGC AAGGCCTGTACTTTTTGAACACGTACAAGAACTCAATCTGTGACGCTGTGGAACACGATCGCCAACGCTTCTCTCTTGGGATTTCCAGGAT	297
<i>tdp2-1</i>		GCTTGC AAGGCCTGTACTTTTTGAACACGTACAAGAACTCAATCTGTGACGCTGTGGAACACGATCGCCAACGCTTCTCTCTTGGGATTTCCAGGAT	
<i>tdp2-2</i>		GCTTGC AAGGCCTGTACTTTTTGAACACGTACAAGAACTCAATCTGTGACGCTGTGGAACACGATCGCCAACGCTTCTCTCTTGGGATTTCCAGGAT	
<i>tdp2-3</i>		GCTTGC AAGGCCTGTACTTTTTGAACACGTACAAGAACTCAATCTGTGACGCTGTGGAACACGATCGCCAACGCTTCTCTCTTGGGATTTCCAGGAT	
<i>tdp2-4</i>		GCTTGC AAGGCCTGTACTTTTTGAACACGTACAAGAACTCAATCTGTGACGCTGTGGAACACGATCGCCAACGCTTCTCTCTTGGGATTTCCAGGAT	
WT	298	TTGACTGATTCGGGCTCGAGAGTAACGACGCTGATTCTCT--CGTCCGGGCTGTTTTCTTCTCTGCGGCGGTGATCAAGCGTAAAGCTATGGATGA	395
<i>tdp2-1</i>		TTGACTGATTCGGGCTCGAGAGTAACGACGCTGATTCTCT--CGTCCGGGCTGTTTTCTTCTCTGCGGCGGTGATCAAGCGTAAAGCTATGGATGA	
<i>tdp2-2</i>		TTGACTGATTCGGGCTCGAGAGTAACGACGCTGATTCTCTA--CGTCCGGGCTGTTTTCTTCTCTGCGGCGGTGATCAAGCGTAAAGCTATGGATGA	
<i>tdp2-3</i>		TTGACTGATTCGGGCTCGAGAGTAACGACGCTGATTCTCTA--CGTCCGGGCTGTTTTCTTCTCTGCGGCGGTGATCAAGCGTAAAGCTATGGATGA	
<i>tdp2-4</i>		TTGACTGATTCGGGCTCGAGAGTAACGACGCTGATTCTCT--CGTCCGGGCTGTTTTCTTCTCTGCGGCGGTGATCAAGCGTAAAGCTATGGATGA	
WT	396	TGACGTCGTGAGGTCGATGGTCTCTGTTGTTGCTCTGAATCGCAAGGTGTCATGAAGAAGAACAAAGAGATTGAAACGAAAGGGGTAGCTTCTGA	495
<i>tdp2-1</i>		TGACGTCGTGAGGTCGATGGTCTCTGTTGTTGCTCTGAATCGCAAGGTGTCATGAAGAAGAACAAAGAGATTGAAACGAAAGGGGTAGCTTCTGA	
<i>tdp2-2</i>		TGACGTCGTGAGGTCGATGGTCTCTGTTGTTGCTCTGAATCGCAAGGTGTCATGAAGAAGAACAAAGAGATTGAAACGAAAGGGGTAGCTTCTGA	
<i>tdp2-3</i>		TGACGTCGTGAGGTCGATGGTCTCTGTTGTTGCTCTGAATCGCAAGGTGTCATGAAGAAGAACAAAGAGATTGAAACGAAAGGGGTAGCTTCTGA	
<i>tdp2-4</i>		TGACGTCGTGAGGTCGATGGTCTCTGTTGTTGCTCTGAATCGCAAGGTGTCATGAAGAAGAACAAAGAGATTGAAACGAAAGGGGTAGCTTCTGA	

Abbildung 3.2: cDNA Analyse von *tdp2* Mutantenlinien

Dargestellt ist das Alignment der durch Sanger-Sequenzierung ermittelten cDNA-Sequenzen der *tdp2*-Mutanten mit der bereits bekannten *TDP2* cDNA-Sequenz des Wildtyps (WT). Startcodons sind in blau dargestellt, Deletionen oder Insertionen in grün und vorzeitige Stopcodons sind rot markiert. Die potentielle Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS) ist grau hervorgehoben. Alle Mutationen sind im ersten Exon lokalisiert und verursachen eine Verschiebung des Leserasters und einen vorzeitigen Translationsstop. Die *tdp2-1* Mutante hat eine 5 bp Deletion an Position 332, die *tdp2-2* und die *tdp2-3* Mutanten haben eine 1 bp Insertion (A) an Position 337 und die *tdp2-4* Mutante hat eine 1 bp Deletion an Position 338.

3.1.2 Charakterisierung von *tdp2* Mutanten

Zur Untersuchung der zellulären Funktion von *TDP2*, wurden zunächst die zwei *tdp2*-Einzelmutanten charakterisiert. Hierfür wurde zunächst der Wuchsphänotyp der beiden Mutanten mit dem des Wildtyps verglichen. Das Saatgut der zu analysierenden Linien wurde dafür zeitgleich in Erde ausgebracht und unter denselben Bedingungen im S1-Gewächshaus kultiviert. Sowohl nach drei, als auch nach fünf

Wochen Anzucht im Gewächshaus, wurden die verschiedenen Linien fotodokumentiert (Abbildung 3.3 A). Die *tdp2* Mutanten wiesen nach drei Wochen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Rosette auf und waren nach fünf Wochen ebenso groß wie der Wildtyp. Auch hinsichtlich des Blütenstands und der Schotengröße war kein Unterschied zum Wildtyp erkennbar.

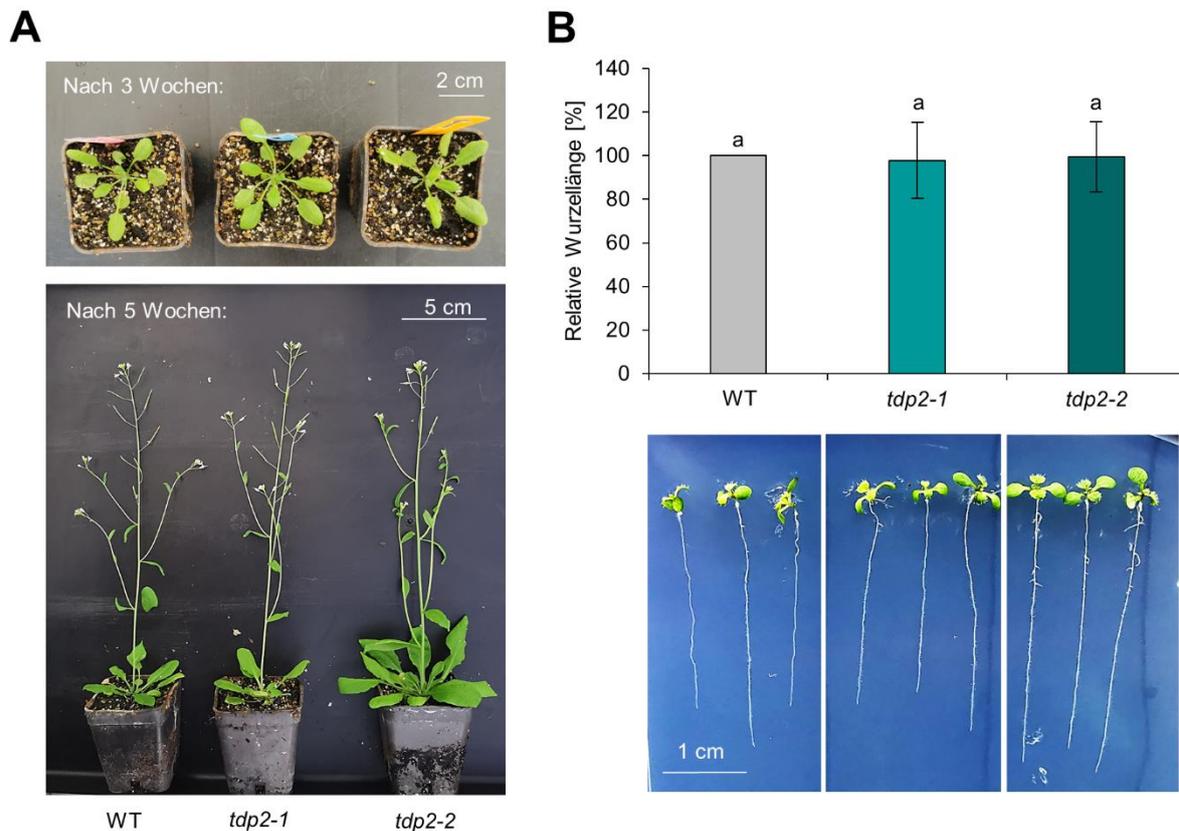


Abbildung 3.3: Charakterisierung von *tdp2*-Mutanten.

A) Dargestellt ist der Wuchstyp der *tdp2-1* und der *tdp2-2* Mutante im Vergleich zum Wildtyp (WT), nach 3 und nach 5 Wochen Anzucht im Gewächshaus. Die *tdp2* Mutanten wiesen keinen Unterschied zum WT auf. **B)** Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Wurzellänge der verschiedenen Genotypen ($n=3$, $N=10$) nach neun Tagen vertikaler Anzucht. Die beiden *tdp2* Mutanten wiesen die gleiche Wurzellänge wie der WT auf. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Statistische Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen T-Test mit ungleicher Varianz ermittelt: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

DNA-Schäden die während der Replikation bestehen bleiben, bewirken eine Verzögerung des Zellzyklus und eine damit einhergehende verringerte Zellteilungsrate. Zur Untersuchung von replikativen DNA-Schäden eignen sich daher Gewebe mit einer starken Zellproliferation, da dort eine eingeschränkte Zellteilungsrate besonders gut sichtbar wird. Das Wurzelmeristem stellt ein solches Gewebe dar, weshalb eine Wurzellängenanalyse mit den *tdp2* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt wurde (siehe Abschnitt 2.2.3.8). Hierfür wurden die verschiedenen Linien für neun Tage aufrecht in einem Pflanzenanzuchtsschrank angezogen und nachfolgend die Wurzellänge mittels des SmartRoot Plugins von ImageJ ausgewertet. In drei unterschiedlichen Versuchsansätzen wurde der Mittelwert von je zehn Wurzeln bestimmt und anhand des Mittelwerts des Wildtyps relativiert. Die *tdp2*

Mutanten wiesen mit einer relativen Wurzellänge von 98 % (*tdp2-1*) und 99 % (*tdp2-2*) die gleiche Wurzellänge wie der Wildtyp auf (Abbildung 3.3 B). Hinsichtlich des Phänotyps konnte dementsprechend kein Unterschied zwischen den *tdp2* Mutanten und dem Wildtyp festgestellt werden. Die Rohdaten der Wurzellängenanalyse können Tabelle 8.5 im Anhang entnommen werden.

Da für das menschliche TDP2-Homolog eine Funktion in der Reparatur von TOP2cc gezeigt werden konnte, sollte dies auch für AtTDP2 analysiert werden. Dazu wurde im nächsten Schritt die Sensitivität der erhaltenen Mutanten gegenüber dem TOP2cc-induzierenden Genotoxin Etoposid (Eto) getestet. Die Analyse der Sensitivität von Mutanten gegen spezifische Genotoxine erfolgt üblicherweise über die Bestimmung des relativen Frischgewichts von je zehn Keimlingen nach 13-tägiger Kultivierung in Genotoxin-haltigem GM-Flüssigmedium (siehe Abschnitt 2.2.3.10). Erste Analysen mit dieser Methode zeigten jedoch, dass der Wildtyp erst bei einer sehr hohen Eto-Konzentration ($> 20 \mu\text{M}$) ein leicht reduziertes Frischgewicht im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Pflanzen aufweist. Aus diesem Grund erschien dieses Testsystem als ungeeignet zur Analyse der Eto-Sensitivität. Das Wurzelmeristem stellt durch seine hohe Teilungsrate ein empfindlicheres System zur Untersuchung von Genotoxin-induzierten Schäden dar. Ein schnelles Wurzelwachstum ist in der Natur durch die starke Konkurrenz von essentieller Bedeutung für die Pflanze, weshalb es von strategischem Vorteil sein kann, wenn beschädigte meristematische Zellen den programmierten Zelltod eingehen, anstatt den Schaden zeitaufwendig zu reparieren (Fulcher & Sablowski, 2009). Zur Untersuchung der Sensitivität gegen Eto, wurde deshalb der Zelltod in Wurzelspitzen quantifiziert (Abschnitt 2.2.3.9). Der Wildtyp, sowie die *tdp2*-Mutanten wurden hierfür auf GM-Festmedium (1 % Agar) ausgebracht und für vier Tage aufrecht in einem Pflanzenanzuchtschrank kultiviert. Zur Analyse der Eto-Sensitivität wurden anschließend je 15 Keimlinge in GM-Flüssigmedium mit $20 \mu\text{M}$ Eto überführt. Da manche Mutanten bereits im unbehandelten Zustand eine erhöhte Anzahl an toten Zellen aufweisen, wurden als Vergleich weitere 15 Keimlinge in genotoxinfreies GM-Flüssigmedium transferiert. Nach 24 h wurden die Wurzeln auf einen Objektträger transferiert, dort mit Propidiumiodid (PI) angefärbt und mittels Konfokalmikroskopie untersucht. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff der nur die perforierte Membran von toten Zellen durchdringen kann und somit die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen ermöglicht. Unbehandelt wiesen die *tdp2* Mutanten, genau wie der Wildtyp keine toten Zellen im Wurzelmeristem auf (Abbildung 3.4). Die Stammzellnische war geordnet ausgebildet und zeigte keine morphologischen Veränderungen. Während die Wildtyp Wurzeln die mit Eto behandelt wurden ebenfalls keine toten Zellen aufwiesen, waren sowohl bei der *tdp2-1*, als auch bei der *tdp2-2* Mutante eine erhöhte Anzahl von etwa 4 Zellen pro Wurzel sichtbar. Die *tdp2* Mutanten unterschieden sich dadurch signifikant vom Wildtyp hinsichtlich ihrer Sensitivität gegen Eto. Somit konnte für das pflanzliche TDP2 Homolog ebenfalls eine Rolle in der in der Reparatur von TOP2cc festgestellt werden. Die Rohdaten der Sensitivitätsanalyse sind im Anhang in Tabelle 8.6 ersichtlich. Da in diesen initialen Analysen festgestellt werden konnte, dass die beiden *tdp2* Mutanten sich nicht in ihrem Phänotyp unterschieden

und vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich ihrer Sensitivität gegen Eto zeigten, wurde die *tdp2-1* Mutante als repräsentative Mutante für weitere Analysen ausgewählt.

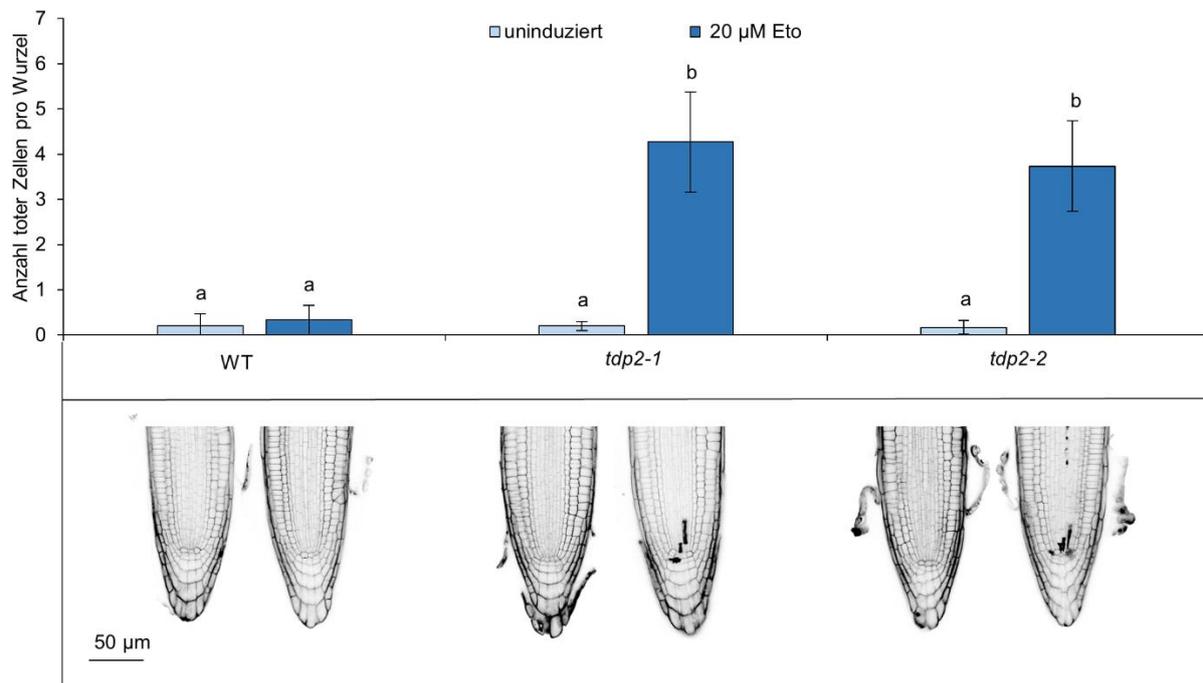


Abbildung 3.4: Analyse der Etoposid Sensitivität von *tdp2* Mutanten.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl toter Zellen in den Wurzelmeristemen der verschiedenen Linie ($n=3$, $N=10$), mit je einer repräsentativen mit Propidiumiodid angefärbten Wurzel. Unbehandelt wiesen der Wildtyp (WT) und die *tdp2* Mutanten keine toten Zellen auf. WT-Wurzeln die für 24 h mit Etoposid (Eto) behandelt wurden wiesen ebenfalls keine toten Zellen auf. Die beiden *tdp2* Mutanten zeigten dagegen nach Behandlung mit Eto eine signifikant erhöhte Anzahl an toten Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Bei der statistischen Analyse wurden sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Wurzeln des jeweiligen Genotyps miteinander verglichen, wie auch die gleich behandelten Wurzeln der verschiedenen Genotypen. Statistische Signifikanzen wurden mit der zweifaktoriellen ANOVA mit einem anschließenden Mehrfachvergleich mit Tukey's Post-Hoc errechnet: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

3.2 ANALYSE VON DPC REPARATURFAKTOREN IN DER REPARATUR VON TOP2CC

Während in Hefe und in Säugern bereits einige Faktoren bekannt sind die in die Reparatur von TOP2cc involviert sind, ist die TOP2cc Reparatur in Pflanzen noch weitestgehend unerforscht. Auch für die bereits charakterisierten DNA-Protein *crosslink* (DPC) Reparaturfaktoren MUS81, WSS1A und TDP1 aus Pflanzen ist noch nicht bekannt ob sie auch zur TOP2cc Reparatur beitragen. Für die Homologe der DPC-Protease WSS1A aus Hefe (Wss1) und dem Menschen (SPRTN) konnte dagegen bereits eine Beteiligung in der TOP2cc Reparatur nachgewiesen werden, da entsprechende Mutantenlinien eine erhöhte Sensitivität gegen Eto aufwiesen (Lopez-Mosqueda *et al.*, 2016; Serbyn *et al.*, 2020). Auch für die Homologe der Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase TDP1, welche vor allem für ihre Funktion in der Hydrolyse der 3'-Phosphodiester Bindung von TOP1cc bekannt ist, konnte in Hefe und in Vertebraten eine Funktion in der Reparatur von TOP2cc beschrieben werden (Nitiss *et al.*, 2006; Murai *et al.*, 2012).

Für die Endonuklease MUS81 wurde dagegen in noch keinem Organismus eine Funktion in der Reparatur von TOP2cc nachgewiesen. Zur Untersuchung ob diese bereits charakterisierten DPC-Reparaturfaktoren auch in Pflanzen zur Reparatur von TOP2cc beitragen, wurden die entsprechenden Mutantenlinien auf ihre Sensitivität gegenüber dem TOP2cc induzierenden Genotoxin Eto überprüft. Hierfür wurde die Anzahl toter Zellen im Wurzelmeristem zwischen unbehandelten, und Wurzeln die mit 20 μM Eto behandelt wurden, verglichen (Abschnitt 2.2.3.9). Die Wurzeln der verschiedenen Genotypen wurden dafür für vier Tage axenisch in einer aufrechten Position kultiviert und dann für weitere 24 h entweder mit Eto behandelt, oder unter den gleichen Bedingungen weiter kultiviert. Nach Färbung mit PI wurden die Wurzeln der einzelnen Mutantenlinien durch mikroskopische Analyse ausgewertet. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

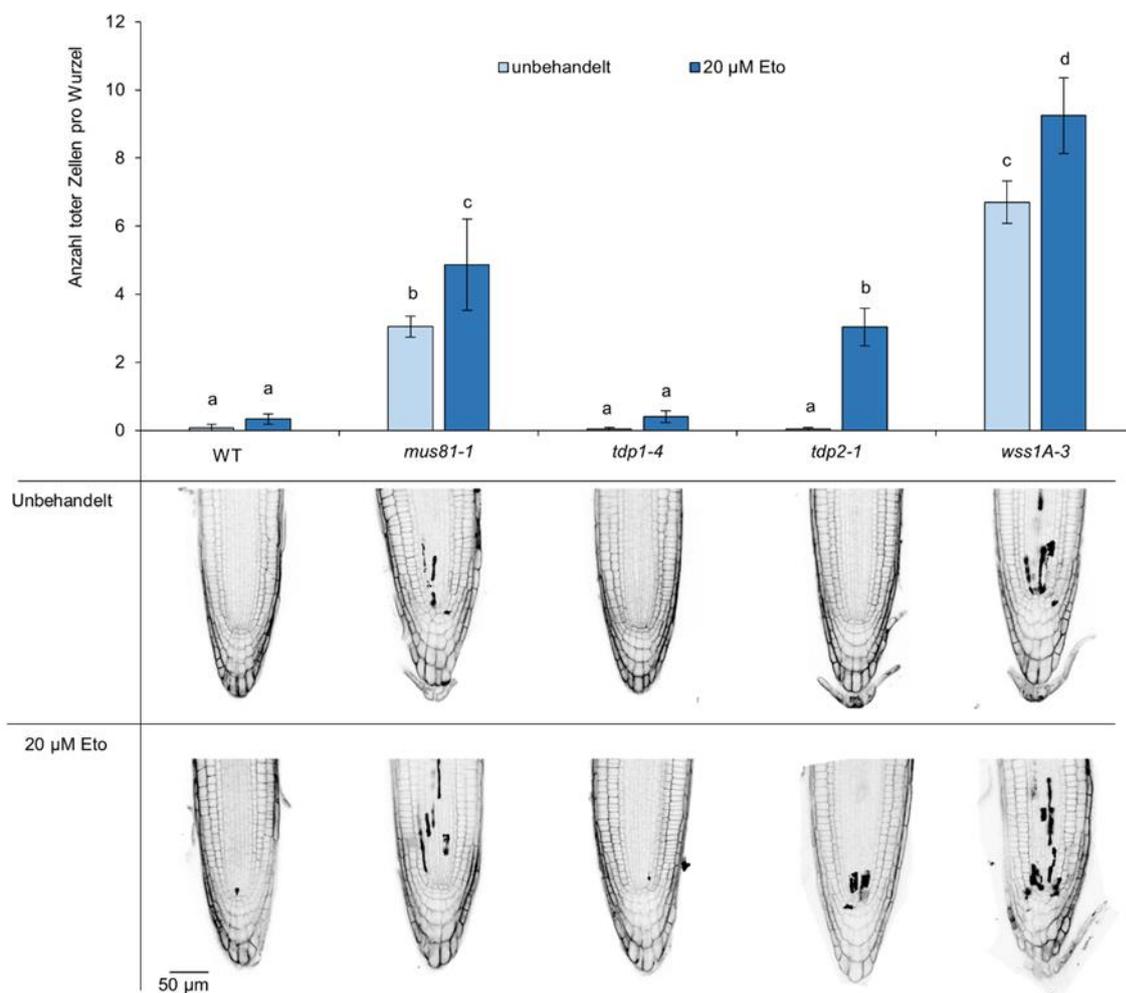


Abbildung 3.5: Etoposid Sensitivitätsanalyse von DPC-Reparaturmutanten

Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl toter Zellen in der Wurzelspitze von fünf Tage alten Keimlingen der verschiedenen Mutantenlinien ($n=3$, $N=10$), mit je einer repräsentativen mit Propidiumiodid gefärbten Wurzel. Unbehandelt wiesen der Wildtyp (WT), die *tdp1* und die *tdp2* Mutante keine toten Zellen im Wurzelmeristem auf, während die *mus81* und die *wss1A* Mutante bereits eine signifikant zum WT erhöhte Anzahl an toten Zellen zeigten. Nach 24 h Behandlung mit 20 μM Etoposid (Eto) zeigten der WT und *tdp1* Mutante immer noch keine toten Zellen. Die *mus81*, die *tdp2* und die *wss1A* Mutanten wiesen eine signifikant erhöhte Anzahl an toten Zellen nach Behandlung mit Eto auf. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Bei der statistischen Analyse wurden sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Wurzeln des jeweiligen Genotyps miteinander verglichen, wie auch die gleich behandelten Wurzeln der verschiedenen Genotypen. Statistische Signifikanzen wurden mit der zweifaktoriellen ANOVA mit einem anschließenden Mehrfachvergleich mit Tukey's Post-Hoc errechnet: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

Der Wildtyp und die *tdp1-4* Mutante zeigten sowohl unbehandelt, als auch nach Behandlung mit Eto keine toten Zellen pro Wurzel. Die *mus81-1*-Mutante wies nach Behandlung mit Eto eine erhöhte Anzahl von etwa 5 toten Zellen auf, während im unbehandelten Zustand etwa 3 tote Zellen pro Wurzel sichtbar waren. Auch die *wss1A-3*-Mutante wies bereits im unbehandelten Zustand eine signifikant erhöhte Anzahl von ca. 7 toten Zellen pro Wurzeln auf, aber die mit 20 μ M Eto behandelten Wurzeln wiesen mit etwa 9 toten Zellen pro Wurzel nochmals signifikant mehr tote Zellen auf. Die *tdp2-1* Mutante zeigte, wie bereits im ersten Test, erst nach der Behandlung mit Eto eine signifikant erhöhte Anzahl von etwa 3 toten Zellen pro Wurzel. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben TDP2 auch WSS1A und eventuell auch MUS81 in die Reparatur von TOP2cc involviert sind, während TDP1 entbehrlich zu sein scheint. Die Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse können im Anhang in Tabelle 8.7 eingesehen werden.

3.3 EINGLIEDERUNG VON TDP2 IN DAS PFLANZLICHE DPC-REPARATURNETZWERK

Neben der 5'-Phosphodiesterase-Aktivität konnte für das TDP2-Homolog von Säugern auch eine 3'-Phosphodiesterase Aktivität *in vitro* demonstriert werden. Durch *in vivo* Analysen konnte diese bestätigt werden und TDP2 somit neben seiner Funktion in der Reparatur von TOP2cc auch eine Rolle in der Reparatur von TOP1cc zugeschrieben werden (Cortes Ledesma *et al.*, 2009). In der TOP1cc Reparatur scheint HsTDP2 aber vor allem in einem *back-up* Mechanismus involviert zu sein, wenn mindestens ein weiterer TOP1cc Reparaturweg ausgeschaltet ist (Zeng *et al.*, 2012). Weiterhin wurde den TDP1-Homologen aus Hefe und Vertebraten eine Funktion in der TOP2cc Reparatur zugeschrieben (Nitiss *et al.*, 2006; Murai *et al.*, 2012). Ob TDP1 und TDP2 auch füreinander in Pflanzen komplementieren und wie MUS81 und WSS1A mit TDP2 in der pflanzlichen DPC-Reparatur interagieren ist dagegen noch unerforscht und daher nicht bekannt. Um TDP2 in das pflanzliche DPC-Reparaturnetzwerk einzuordnen und die Beziehungen zwischen den verschiedenen Reparaturfaktoren zu ermitteln, wurden daher im Folgenden Epistasis Analysen mit entsprechenden Doppelmutantenlinien durchgeführt. Da bereits bekannt ist wie MUS81, WSS1A und TDP1 in der pflanzlichen DPC-Reparatur miteinander interagieren, wurde der Hauptfokus auf die Interaktion mit TDP2 gelegt.

3.3.1 Charakterisierung von *tdp1 tdp2* Doppelmutanten

In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass TDP1 in der Lage ist die Abwesenheit von TDP2 zu kompensieren und umgekehrt, dass auch TDP2 in seiner zellulären Funktion dem Verlust von TDP1 entgegenwirken kann (Murai *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2012). Im Gegensatz zum Homolog aus Vertebraten, hat das pflanzliche TDP1-Homolog jedoch keine direkte Funktion in der Reparatur von TOP1cc und wirkt vor allem als *back-up* Mechanismus, wenn einer der Hauptreparaturfaktoren, WSS1A

oder MUS81, abwesend ist (Enderle *et al.*, 2019). Dabei wäre es allerdings möglich, dass TDP2 in Abwesenheit von TDP1 dessen Funktion übernimmt und die 3'-Phosphodiesterbindung des TOP1cc anstelle von TDP1 hydrolysiert. Obwohl die *tdp1* Mutante in ersten Analysen keine Sensitivität gegen Eto zeigte, wäre es ebenso möglich, dass TDP1 in Abwesenheit von TDP2 eine Funktion in der Reparatur von TOP2cc erfüllt. Zur Untersuchung ob TDP1 und TDP2 in Abwesenheit des jeweils anderen die Funktion in der Reparatur des jeweiligen TOPcc kompensieren können, wurden Epistasisis Analysen mit der Cas9 generierten *tdp2-3 tdp1-4* Doppelmutante (Abschnitt 3.1.1) durchgeführt. Hierfür wurde die Doppelmutante zunächst hinsichtlich ihres Wuchsphänotyps charakterisiert. Sowohl nach drei, als auch nach fünf Wochen Anzucht in Erde entsprach der Wuchsphänotyp der *tdp2-3 tdp1-4* Doppelmutante dem des Wildtyps, sowie auch dem der beiden Einzelmutanten, die ebenfalls einen normalen Wuchsphänotyp aufwiesen (Abbildung 3.6 A).

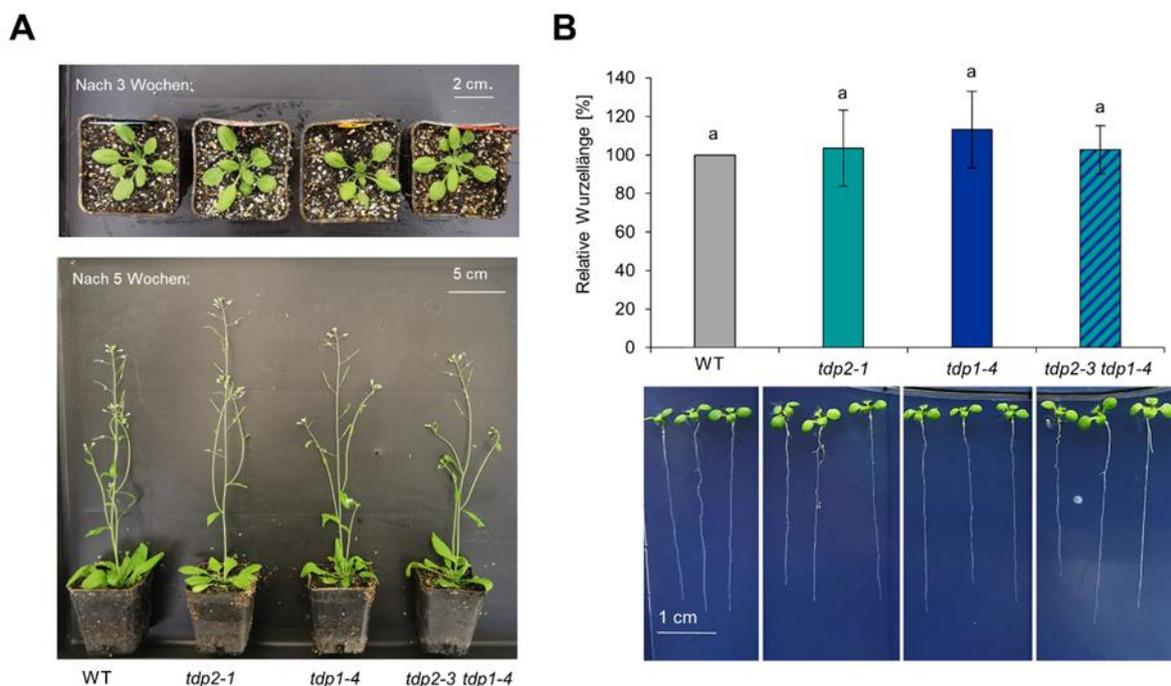


Abbildung 3.6: Phänotypisierung der *tdp2 tdp1* Doppelmutante.

A) Dargestellt ist der Wuchsphänotyp der *tdp2 tdp1* Doppelmutante im Vergleich zu den beiden Einzelmutanten und dem Wildtyp (WT). Die Doppelmutante wies sowohl nach drei als auch nach fünf Wochen Anzucht in Erde den gleichen Phänotyp wie der WT und die Einzelmutanten auf. **B)** Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Wurzellänge der verschiedenen Genotypen nach neun Tagen aufrechter axenischer Anzucht ($n=3$, $N=10$), mit je drei repräsentativen Wurzeln pro Genotyp. Die *tdp2 tdp1* Doppelmutante wies die gleiche Wurzellänge wie auch der WT und die beiden Einzelmutanten auf. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Statistische Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen T-Test mit ungleicher Varianz ermittelt: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

Da das Wurzelmeristem empfindlicher gegenüber replikativen Schäden ist, wodurch das Wurzelwachstum eingeschränkt werden kann, wurde als nächstes die Wurzellänge der verschiedenen Mutantenlinien untersucht (Abschnitt 2.2.3.8). Nach neun Tagen Anzucht in einer aufrechten Position wurde hierfür die Länge der jeweiligen Wurzeln mithilfe des SmartRoot Plugins von ImageJ

ausgemessen und die resultierende Wurzellänge der verschiedenen Mutantenlinien anhand der mittleren Wurzellänge des Wildtyps relativiert. Mit einer relativen Wurzellänge von 103 % unterschied sich die *tdp2-3 tdp1-4* Doppelmutante jedoch weder vom Wildtyp noch von den Einzelmutanten *tdp1-4* und *tdp2-1*, die relative Wurzellängen von 113 % bzw. 104 % aufwiesen (Abbildung 3.6 B). Die Rohdaten der Wurzellängenanalyse können aus Tabelle 8.8 aus dem Anhang entnommen werden.

Um zu analysieren ob TDP2 eine Funktion in der Reparatur von TOP1cc hat, wurde nachfolgend eine CPT-Sensitivitätsanalyse durchgeführt, da CPT spezifisch die Entstehung von TOP1cc induziert. Hierfür wurde das Saatgut der verschiedenen Linien zunächst auf GM-Festmedium ausgebracht und nach einer Woche axenischer Anzucht in GM-Flüssigmedium umgesetzt (Abschnitt 2.2.3.10). Einen weiteren Tag später wurde die CPT Genotoxinlösung in verschiedenen Konzentrationen beigefügt (Endkonzentrationen: 150 nM, 300 nM, 600 nM und 1200 nM). Zwei Proben jeder Linie wurden nicht mit CPT behandelt und dienten anschließend als Normwert des jeweiligen Genotyps, zur Berechnung des relativen Frischgewichts. Nach weiteren 13 Tagen Kultivierung wurde das Frischgewicht von je zehn Pflanzen mittels einer Feinwaage bestimmt. Die Mittelwerte des relativen Frischgewichts aus drei unabhängigen Versuchsansätzen sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.7 dargestellt. Bei keiner CPT-Konzentration konnte ein Unterschied im Frischgewicht der *tdp2-3 tdp1-4* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Ebenso wie die *tdp2-1* und die *tdp1-4* Einzelmutanten, wies die Doppelmutante keine verstärkte Sensitivität gegen CPT auf. Dies bedeutet, dass das pflanzliche TDP2 Homolog keine essenzielle Rolle bei der Reparatur von TOP1cc spielt. Die Rohdaten der Sensitivitätsanalyse können in Tabelle 8.9 im Anhang eingesehen werden.

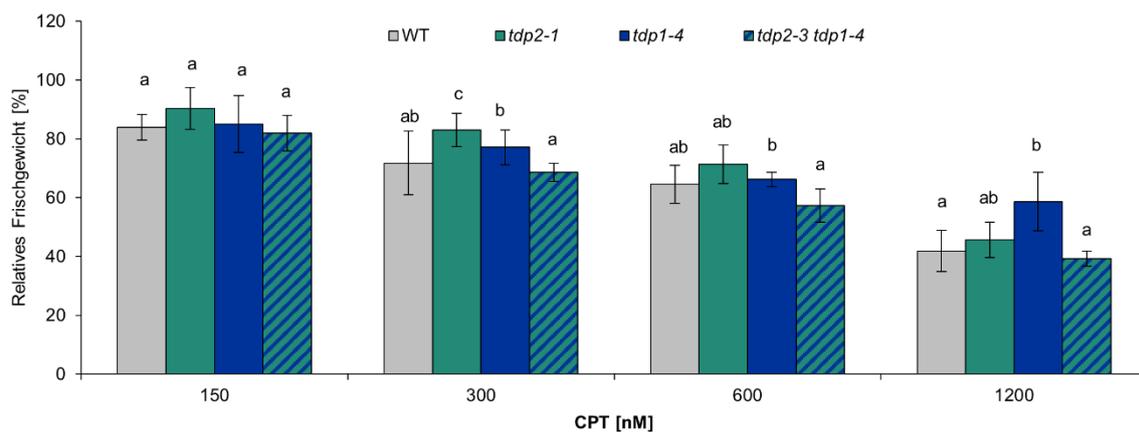


Abbildung 3.7: CPT Sensitivitätsanalyse von *tdp2 tdp1* Doppelmutanten.

Dargestellt ist der Mittelwert des relativen Frischgewichts von je zehn Pflanzen nach 13-tägiger Behandlung mit verschiedenen CPT-Konzentrationen (n=3). Die *tdp2 tdp1* Doppelmutante und die jeweiligen Einzelmutanten wiesen bei allen CPT-Konzentrationen keine verstärkte Sensitivität auf. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Statistische Signifikanzen innerhalb der einzelnen CPT-Konzentrationen wurden mithilfe der einfaktoriellen ANOVA, mit nachfolgendem Mehrfachvergleich der verschiedenen Mutanten mittels Tukey's Post-Hoc, ermittelt: a ≠ b, wenn p < 0,05. n = Anzahl der Versuchsansätze.

Um zu testen ob TDP1 in Abwesenheit von TDP2 bei der Reparatur von TOP2cc beteiligt ist, wurde eine Eto-Sensitivitätsanalyse durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.9). Hierfür wurde die Anzahl toter Zellen im Wurzelmeristem von fünf Tage alten Pflanzen nach Färbung mit PI ermittelt. Unbehandelt wies die *tdp2-3 tdp1-4* Doppelmutante, wie auch die beiden Einzelmutanten und der Wildtyp keine toten Zellen im Wurzelmeristem auf (Abbildung 3.8). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wiesen *tdp2-3 tdp1-4* Doppelmutanten die mit 20 μ M Eto behandelt wurden, mit etwa 3 toten Zellen pro Wurzel eine signifikant erhöhte Sensitivität gegen Eto auf. Die Anzahl toter Zellen unterschied sich dabei aber nicht signifikant von der *tdp2-1* Einzelmutante, welche etwa 4 tote Zellen pro Wurzel aufwies. Damit konnte gezeigt werden, dass TDP1 auch in Abwesenheit von TDP2 keine Funktion in der Reparatur von TOP2cc einnimmt. Die Rohdaten zur Eto-Sensitivitätsanalyse können in Tabelle 8.10 im Anhang eingesehen werden.

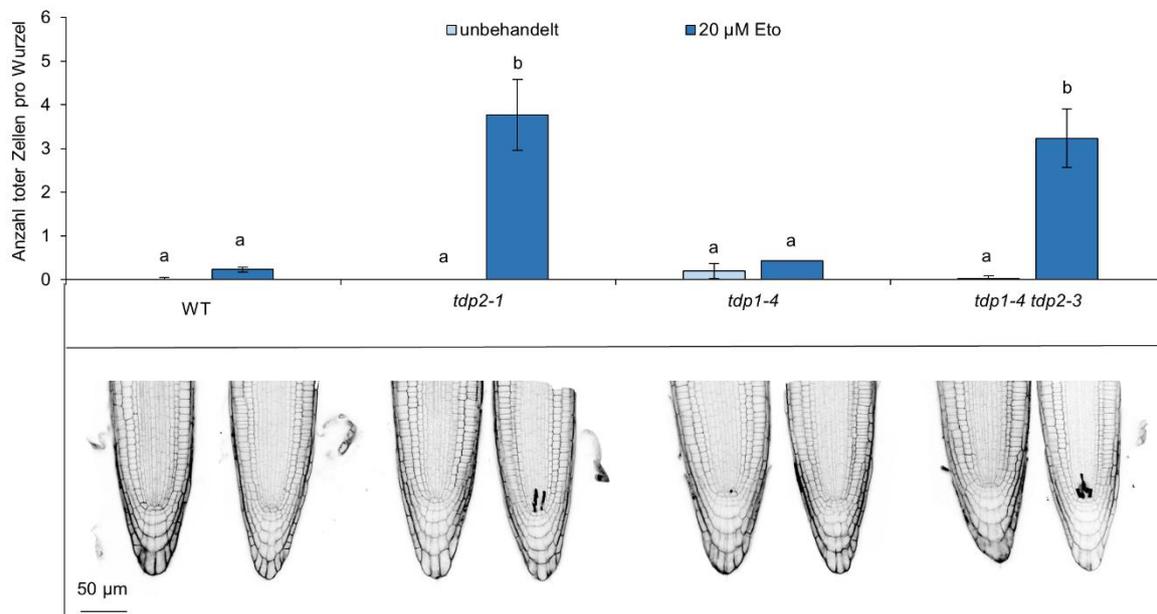


Abbildung 3.8: Etoposid Sensitivitätsanalyse der *tdp2 tdp1* Doppelmutante

Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl toter Zellen im Wurzelmeristem von fünf Tage alten Keimlingen, mit je einer exemplarischen mit Propidiumiodid angefärbten Wurzel ($n=3$, $N=10$). Unbehandelt wies die *tdp2 tdp1* Doppelmutante, sowie die entsprechenden Einzelmutanten und der Wildtyp (WT) keine toten Zellen im Wurzelmeristem auf. *Tdp2 tdp1* Wurzeln die dagegen für 24 h mit 20 μ M Etoposid (Eto) behandelt wurden, wiesen zwar eine erhöhte Anzahl an toten Zellen auf, unterschieden sich dabei aber nicht von der *tdp2* Einzelmutante. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Bei der statistischen Analyse wurden sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Wurzeln des jeweiligen Genotyps miteinander verglichen, wie auch die gleich behandelten Wurzeln der verschiedenen Genotypen. Statistische Signifikanzen wurden mit der zweifaktoriellen ANOVA mit einem anschließenden Mehrfachvergleich mit Tukey's Post-Hoc errechnet: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

3.3.2 Charakterisierung von *tdp2 mus81* Doppelmutanten

Während TDP1 nur eine untergeordnete Rolle spielt, ist die Endonuklease MUS81 der Hauptfaktor in der pflanzlichen TOP1cc Reparatur (Enderle *et al.*, 2019). Der Mechanismus durch welchen MUS81

zur DPC-Toleranz beiträgt, ist wahrscheinlich die endonukleolytische Induktion eines einseitigen DSB an angehaltenen Replikationsgabeln, durch welchen nachfolgende Reparaturmechanismen die Umgehung des DPCs bewirken können (Regairaz *et al.*, 2011; Pardo *et al.*, 2020). Da MUS81 die DNA unabhängig von der Art des DPCs schneiden kann, wäre eine Funktion in der Reparatur von TOP2cc ebenfalls möglich. In ersten Analysen wiesen pflanzliche *mus81* Mutanten zwar nur eine leichte Sensitivität gegen das TOP2cc induzierende Genotoxin Eto auf, es könnte jedoch sein, dass MUS81 in Abwesenheit von TDP2 eine verstärkte Funktion in der Reparatur übernimmt. Ebenso wäre es möglich, dass TDP2 in Abwesenheit von MUS81 bei der Reparatur von TOP1cc beteiligt ist.

Um die Interaktion von MUS81 und TDP2 in der DPC Reparatur zu untersuchen, wurde eine *tdp2 mus81* Doppelmutantenlinie etabliert. Hierfür wurden die homozygoten *tdp2-1* und *mus81-1* Einzelmutanten miteinander gekreuzt und in der F2-Generation genotypisiert (Abschnitt 2.2.3.5). Die dabei identifizierten homozygoten Doppelmutanten wurden für nachfolgende Analysen weitervermehrt.

Die neu generierte *tdp2-1 mus81-1* Doppelmutante wurde zunächst hinsichtlich phänotypischer Auffälligkeiten untersucht. Zum Vergleich wurde das Saatgut des Wildtyps, der beiden Einzelmutanten und der *tdp2-1 mus81-1* Doppelmutante zeitgleich in Erde ausgebracht und unter denselben Bedingungen im S1-Gewächshaus kultiviert. Nach zwei Wochen wies die Doppelmutante, sowie die *mus81-1* und die *tdp2-1* Einzelmutanten eine mit dem Wildtyp vergleichbare Rosette auf (Abbildung 3.9 A oben). Auch nach weiteren drei Wochen Kultivierung, war kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und den einzelnen Mutantenlinien ersichtlich (Abbildung 3.9 A unten).

Da das Wurzelmeristem empfindlicher auf replikative Schäden reagiert und somit einen Indikator für Defizite in der DNA-Reparatur darstellt, wurde als nächstes eine Wurzellängenanalyse durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.8). Das Saatgut des Wildtyps und der verschiedenen *tdp2-1* und *mus81-1* Mutantenlinien wurde hierfür unter sterilen Bedingungen auf GM-Festmedium ausgebracht und für neun Tage in einer aufrechten Position angezogen. Anschließend wurden die Wurzeln der verschiedenen Mutanten fotodokumentiert und die Länge der Wurzeln mittels des SmartRoot Plugins von ImageJ ermittelt. Die Ergebnisse der Auswertung sind in einem Balkendiagramm in Abbildung 3.9 B dargestellt. Während sich die *tdp2-1* Mutante mit einer relativen Wurzellänge von 95 % nicht vom Wildtyp unterschied, wies die *mus81-1* Einzelmutante mit einer relativen Wurzellänge von 65 % signifikant verkürzte Wurzeln auf. Die *tdp2-1 mus81-1* Doppelmutante wies mit einer relativen Wurzellänge von 64 % ebenfalls signifikant verkürzte Wurzeln auf, aber auf demselben Niveau wie die *mus81-1* Einzelmutante. Die Rohdaten der Wurzellängenanalyse sind Tabelle 8.11 aus dem Anhang zu entnehmen.

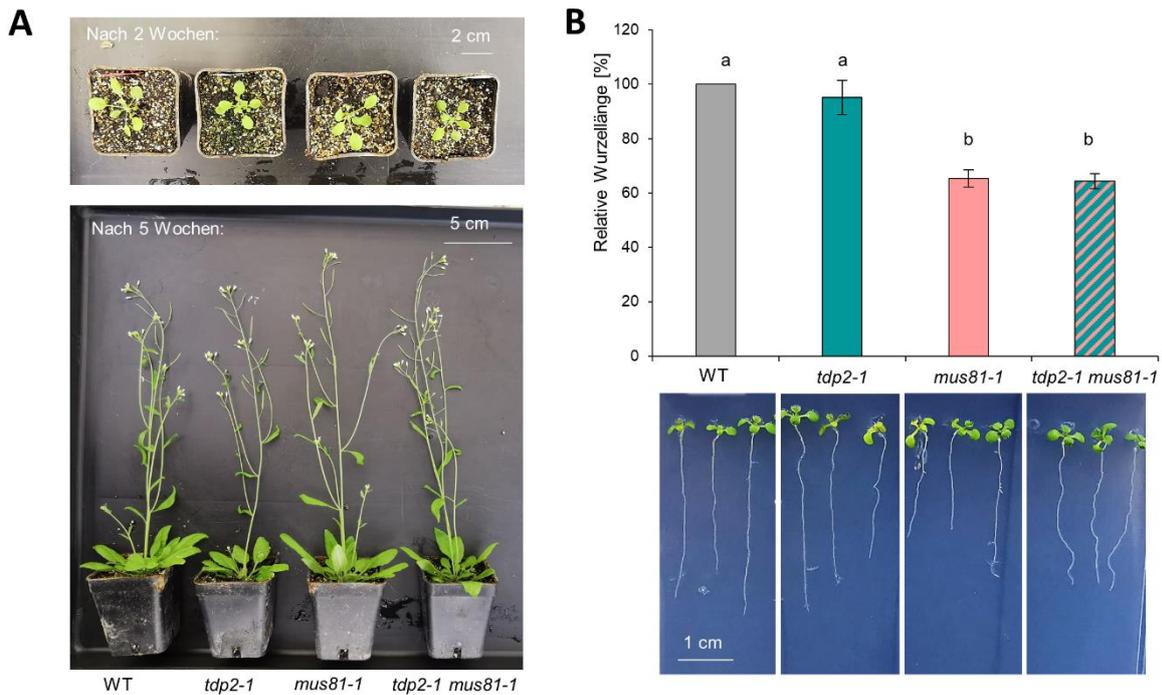


Abbildung 3.9: Phänotypisierung der *tdp2 mus81* Doppelmutante

A) Dargestellt ist der Wuchsphänotyp der *tdp2 mus81* Doppelmutante im Vergleich zu den beiden Einzelmutanten und dem Wildtyp (WT). Die Doppelmutante wies sowohl nach drei als auch nach fünf Wochen Anzucht in Erde den gleichen Phänotyp wie der WT und die Einzelmutanten auf. **B)** Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Wurzellänge der verschiedenen Genotypen nach neun Tagen aufrechter axenischer Anzucht ($n=3$, $N=10$), mit je drei exemplarischen Wurzeln pro Genotyp. Die *mus81 tdp2* Doppelmutante wies ähnlich lange Wurzeln wie die *mus81* Einzelmutante auf und zeigte eine signifikant reduzierte Wurzellänge im Vergleich zum WT und zur *tdp2* Mutante auf. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Statistische Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen T-Test mit ungleicher Varianz ermittelt: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

Um zu untersuchen ob TDP2 in Abwesenheit von MUS81 eine Funktion in der Reparatur von TOP1cc hat, wurde im nächsten Schritt eine CPT-Sensitivitätsanalyse durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.10). Hierfür wurde das relative Frischgewicht von drei Wochen alten Pflanzen nach zweiwöchiger Behandlung mit verschiedenen CPT Konzentrationen bestimmt. Anhand von je zwei unbehandelten Kontrollen jedes Genotyps wurde das relative Frischgewicht bestimmt, welches als Säulendiagramm in Abbildung 3.10 grafisch dargestellt ist. Die *mus81-1* Einzelmutante und die *mus81-1 tdp2-1* Doppelmutante wiesen bei allen Konzentrationen ein vergleichbar signifikant reduziertes Frischgewicht im Vergleich zum Wildtyp und zur *tdp2-1* Mutante auf. Bei allen CPT-Konzentrationen von 150 nM bis 1200 nM wiesen die *mus81-1* und *tdp2-1 mus81-1* Mutanten ein etwa um die Hälfte reduziertes Frischgewicht (~40 %, 30 %, 25 % und 20 % entsprechend der CPT-Konzentrationen 150 nM, 300 nM, 600 nM und 1200 nM) im Vergleich zum Wildtyp und zur *tdp2-1* Mutante (~80 %, 65 %, 55 % und 40 % entsprechend der CPT-Konzentrationen 150 nM, 300 nM, 600 nM und 1200 nM) auf. Das relative Frischgewicht der *mus81-1* Einzelmutante und der *tdp2-1 mus81-1* Mutante lag auf einem vergleichbaren Niveau und es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Linien. Dies bedeutet, dass TDP2 nicht als *back-up* für MUS81 in der TOP1cc Reparatur fungieren kann. Die Rohdaten der Sensitivitätsanalyse sind Tabelle 8.12 aus dem Anhang zu entnehmen.

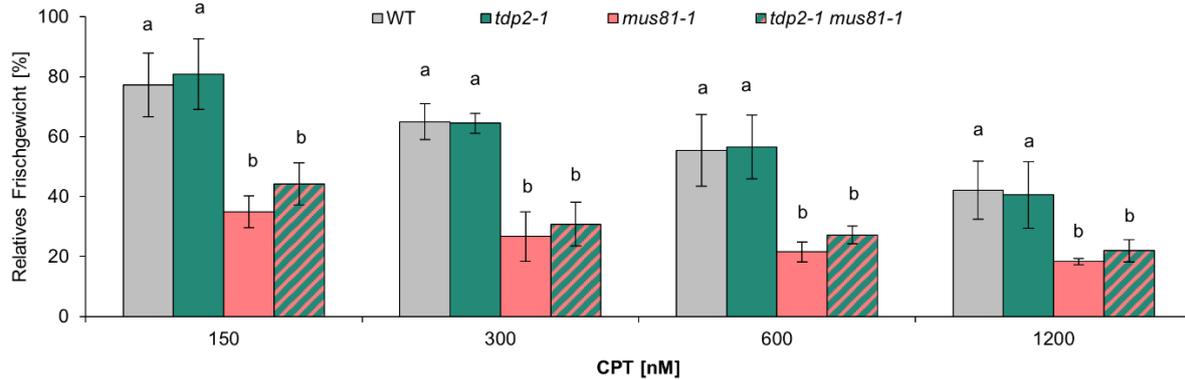


Abbildung 3.10: CPT Sensitivitätsanalyse der *tdp2 mus81* Doppelmutante.

Dargestellt ist der Mittelwert des relativen Frischgewichts von je zehn Pflanzen nach 13-tägiger Behandlung mit verschiedenen CPT-Konzentrationen ($n=3$). Die *tdp2 mus81* Doppelmutante und die *mus81* Einzelmutante wiesen bei allen Konzentrationen ein vergleichbares Frischgewicht auf, welches im Vergleich zum Wildtyp (WT) und zur *tdp2* Einzelmutante signifikant reduziert war. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Statistische Signifikanzen innerhalb der einzelnen CPT-Konzentrationen wurden mithilfe der einfaktoriellen ANOVA, mit nachfolgendem Mehrfachvergleich der verschiedenen Mutanten mittels Tukey's Post-Hoc ermittelt: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze.

Zur Analyse der Interaktion von TDP2 und MUS81 in der Reparatur von TOP2cc wurde die *tdp2 mus81* Doppelmutante auf ihre Sensitivität gegen das TOP2cc induzierende Genotoxin Eto untersucht. Hierfür wurde die Anzahl toter Zellen in Wurzelmeristemen fünf Tage alter Keimlinge untersucht (Abschnitt 2.2.3.9). Zur Visualisierung der toten Zellen, wurden die Wurzel vor der mikroskopischen Untersuchung mit PI angefärbt, das selektiv in die DNA toter Zellen interkaliert. Die Ergebnisse der Sensitivitätsanalyse sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Unbehandelt wiesen die *mus81-1* Einzelmutante und die *tdp2-1 mus81-1* Doppelmutante bereits eine ähnlich erhöhte Anzahl von 4 (*mus81-1*) und 5 (*tdp2-1 mus81-1*) toten Zellen pro Wurzel auf, während der Wildtyp und die *tdp2-1* Mutante keine toten Zellen im unbehandelten Zustand aufwiesen. Eine 24-stündige Behandlung mit 20 μM Eto bewirkte, dass die *tdp2-1* Mutante, wie bereits in vorherigen Versuchen, eine signifikant erhöhte Anzahl von 6 toten Zellen aufwies und somit eine starke Sensitivität gegen Eto zeigte. Die *mus81-1* Einzelmutante zeigte dagegen nur eine leicht erhöhte Anzahl von 5 toten Zellen pro Wurzel, die sich nicht signifikant von den unbehandelten Wurzeln unterschied. Die *tdp2-1 mus81-1* Doppelmutante wies mit einer Anzahl von 9 toten Zellen pro Wurzel einen additiven Effekt mit einer signifikant erhöhten Sensitivität gegen Eto, im Vergleich zu beiden Einzelmutanten, auf. Dies bedeutet, dass MUS81 wahrscheinlich eher eine untergeordnete Rolle in der TOP2cc Reparatur spielt. Die Rohdaten der Sensitivitätsanalyse gegen Eto können im Anhang (Tabelle 8.13) eingesehen werden.

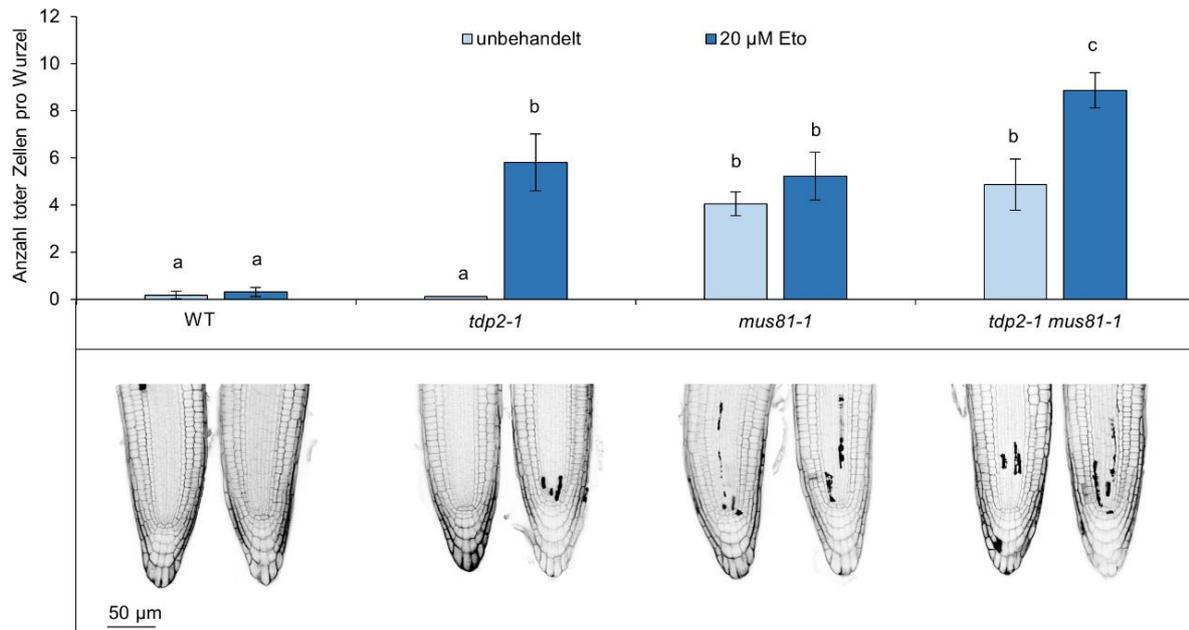


Abbildung 3.11: Etoposid Sensitivitätsanalyse der *tdp2 mus81* Doppelmutante.

Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl toter Zellen im Wurzelmeristem von fünf Tage alten Keimlingen, mit je einer exemplarischen mit Propidiumiodid angefärbten Wurzel ($n=3$, $N=10$). Unbehandelt wiesen der Wildtyp (WT) und die *tdp2* Einzelmutante keine toten Zellen auf, während die *mus81* Einzelmutante und die *tdp2 mus81* Doppelmutante eine vergleichbar erhöhte Anzahl an toten Zellen zeigten. Nach 24 h Behandlung mit 20 µM Etoposid (Eto) wiesen die *tdp2* Einzelmutante und die *tdp2 mus81* Doppelmutante eine signifikant erhöhte Anzahl an toten Zellen im Wurzelmeristem auf und zeigten somit eine verstärkte Sensitivität gegen Eto. Die *mus81* Einzelmutante und der WT zeigten dagegen keine Sensitivität gegen Eto. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Bei der statistischen Analyse wurden sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Wurzeln des jeweiligen Genotyps miteinander verglichen, wie auch die gleich behandelten Wurzeln der verschiedenen Genotypen. Statistische Signifikanzen wurden mit der zweifaktoriellen ANOVA mit einem anschließenden Mehrfachvergleich mit Tukey's Post-Hoc errechnet: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

3.3.3 Charakterisierung von *tdp2 wss1A* Doppelmutanten

Initiale Sensitivitätsanalysen in Pflanzen zeigten, dass sowohl *tdp2*, als auch *wss1A* Mutanten sensitiv auf die Behandlung mit Eto reagierten, weshalb den beiden Faktoren eine Funktion in der Reparatur von TOP2cc zugewiesen werden kann (Abschnitt 3.3). Diese Ergebnisse stimmen mit vorhergehenden Analysen in Vertebraten überein, da auch dort durch verschiedenste Analysen gezeigt werden konnte, dass SPRTN, das funktionelle Homolog der DPC-Protease WSS1A aus Säugern, und TDP2 bei der Reparatur von TOP2cc beteiligt sind (Cortes Ledesma *et al.*, 2009; Lopez-Mosqueda *et al.*, 2016). Auch in Hefe konnte gezeigt werden, dass $\Delta wss1$ Mutanten ein verringertes Wachstum bei Behandlung mit Eto aufwiesen und das Hefe Homolog von WSS1A somit auch in der Reparatur von TOP2cc involviert ist (Serbyn *et al.*, 2020). Unbekannt ist dagegen noch, ob WSS1A und TDP2 in der TOP2cc Reparatur nacheinander, in demselben Weg agieren, oder ob die beiden Faktoren in unterschiedlichen Wegen arbeiten. Epistasie Analysen mit der durch Cas9-vermittelte Mutagenese generierten *tdp2-4 wss1A-3* Doppelmutante (Abschnitt 3.1.1), sollten daher Aufschluss über die genetische Interaktion von WSS1A und TDP2 in der DPC-Reparatur geben. Hierfür wurde zunächst der Wuchstyp der *tdp2-4 wss1A-3* Doppelmutante auf phänotypische Auffälligkeiten untersucht. Bereits nach zweiwöchiger

Kultivierung unter denselben Bedingungen war ein Unterschied in der Rosettenbildung ersichtlich. Die Rosette der *tdp2-4 wss1A-3* Doppelmutante war deutlich kleiner als die der beiden Einzelmutanten und der des Wildtyps (Abbildung 3.12 A, oben). Nach weiteren drei Wochen der Kultivierung, wies die *wss1A-3* Mutante den charakteristischen faszierten Wuchstyp und ein verringertes Wachstum auf, wohingegen die *tdp2-1* Mutante nicht vom Wildtyp unterscheidbar war (Abbildung 3.12 A, unten). Auch die *tdp2-4 wss1A-3* Doppelmutante wies den *wss1A*-charakteristischen faszierten Wuchstyp auf, zeigte aber zusätzlich eine noch stärker reduzierte Pflanzengröße als die *wss1A-3* Einzelmutante.

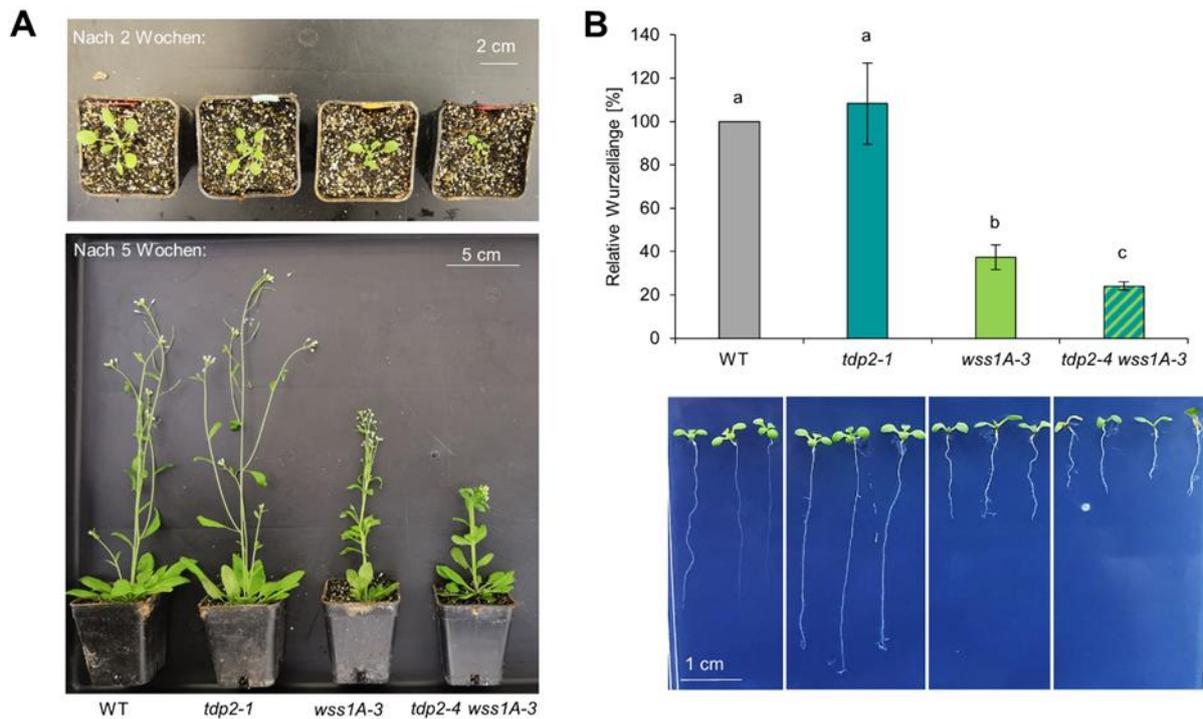


Abbildung 3.12: Phänotypisierung der *tdp2 wss1A* Doppelmutante.

A) Dargestellt ist der Wuchstyp der *tdp2 wss1A* Doppelmutante im Vergleich zu den beiden Einzelmutanten und dem Wildtyp (WT). Nach zweiwöchiger Kultivierung wies die *tdp2 wss1A* Doppelmutante eine deutlich kleinere Rosette als die beiden Einzelmutanten und der Wildtyp auf. Nach fünfwöchiger Kultivierung fiel die *tdp2 wss1A* Doppelmutante weiterhin durch ein stark reduziertes Wachstum und faszierten Phänotyp auf. Die *wss1A* Einzelmutante zeigte ebenfalls den faszierten Wuchstyp, war in ihrem Wachstum aber nicht so stark eingeschränkt wie die Doppelmutante. B) Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Wurzellänge der verschiedenen Genotypen nach neun Tagen aufrechter axenischer Anzucht (n=4; N=10), mit je drei bis vier exemplarischen Wurzeln pro Genotyp. Während die *tdp2* Einzelmutante gleich lange Wurzeln wie der WT aufwies, zeigte die *wss1A* Einzelmutante eine stark reduzierte Wurzellänge auf. Die Wurzeln der *tdp2 wss1A* Doppelmutante waren nochmals signifikant kürzer, als die der *wss1A* Einzelmutante. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Statistische Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen T-Test mit ungleicher Varianz ermittelt: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

Um diese phänotypischen Auffälligkeiten noch genauer zu untersuchen, wurde eine Wurzellängenanalyse durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.8). Nach neuntägiger aufrechter Kultivierung auf festem GM-Medium, wurde hierfür die Wurzellänge des Wildtyps und der verschiedenen Mutantenlinien mithilfe des SmartRoot Plugins von ImageJ ausgewertet. Während sich die *tdp2-1* Mutante mit einer relativen Wurzellänge von 108 % nicht vom Wildtyp unterschied, wies die *wss1A-3* Mutante mit einer relativen Wurzellänge von 37 % bereits stark verkürzte Wurzeln auf (Abbildung 3.12 B). Die *tdp2-4 wss1A-3*

Doppelmutante wies mit einer relativen Wurzellänge von 24 % eine signifikant noch stärkere Beeinträchtigung des Wurzelwachstums auf, als die *wss1A-3* Einzelmutante. Die Rohdaten der Wurzellängenanalyse können in Tabelle 8.14 im Anhang eingesehen werden.

Der Phänotyp der *tdp2-4 wss1A-3* Doppelmutante deutet daraufhin, dass beide Faktoren in parallelen Wegen der DNA-Reparatur arbeiten. Um eine potentielle Funktion von TDP2 als *back-up* für WSS1A in der Reparatur von TOP1cc zu untersuchen, wurde eine CPT-Sensitivitätsanalyse durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.10). Nach zweiwöchiger Behandlung mit verschiedenen CPT-Konzentrationen, wurde hierfür das relative Frischgewicht der verschiedenen Genotypen ermittelt. Bei einer CPT-Konzentration von 150 nM und 300 nM wies keine der Mutantenlinien einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf (Abbildung 3.13). Bei einer Konzentration von 600 nM und 1200 nM CPT dagegen, wiesen die *wss1A-3* Einzelmutante (44 % und 36 %) und die *tdp2-4 wss1A-3* Doppelmutante (36 % und 22 %) ein signifikant reduziertes relatives Frischgewicht im Vergleich zum Wildtyp (65 % und 42 %) und zur *tdp2-1* Mutante (71 % und 46 %) auf. Zwischen dem relativen Frischgewicht der *wss1A-3* Mutante und der *tdp2-4 wss1A-3* Doppelmutante war kein statistisch signifikanter Unterschied detektierbar. Dies bedeutet, dass TDP2 auch in Abwesenheit von WSS1A nicht in die TOP1cc Reparatur involviert ist. Die Rohdaten der Sensitivitätsanalyse können in Tabelle 8.15 im Anhang eingesehen werden.

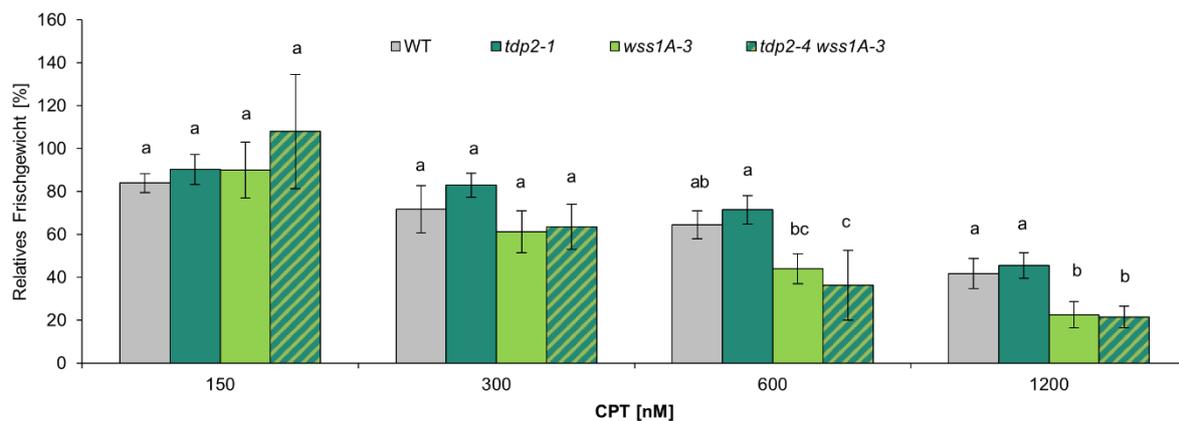


Abbildung 3.13: CPT Sensitivitätsanalyse der *tdp2 wss1A* Doppelmutante.

Dargestellt ist der Mittelwert des relativen Frischgewichts von je zehn Pflanzen, nach 13-tägiger Behandlung mit verschiedenen CPT-Konzentrationen (n=3). Bei einer CPT-Konzentration von 150 nM und 300 nM wiesen alle Mutantenlinien ein mit dem Wildtyp (WT) vergleichbares relatives Frischgewicht auf. Bei einer CPT-Konzentration von 600 nM und 1200 nM wiesen die *tdp2 wss1A* Doppelmutante und die *wss1A* Einzelmutante ein vergleichbares relatives Frischgewicht auf, welches im Vergleich zum WT und zur *tdp2* Einzelmutante signifikant reduziert war. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Statistische Signifikanzen innerhalb der einzelnen CPT-Konzentrationen wurden mithilfe der einfaktoriellen ANOVA, mit nachfolgendem Mehrfachvergleich der verschiedenen Mutanten mittels Tukey's Post-Hoc ermittelt: a ≠ b, wenn p < 0,05. n = Anzahl der Versuchsansätze.

Sowohl für TDP2 als auch für WSS1A konnte in initialen Analysen eine Funktion in der Reparatur von TOP2cc zugeordnet werden. Um herauszufinden ob TDP2 und WSS1A in demselben oder in parallelen Wegen in der TOP2cc Reparatur fungieren, wurde eine Eto-Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Hierfür wurde die Anzahl toter Zellen in den Wurzelmeristemen von unbehandelten Wurzeln und von Wurzeln,

die für 24 h mit 20 μM Eto behandelt wurden, verglichen (Abschnitt. 2.2.3.9). Die Wurzeln wurden, nach Anfärbung der toten Zellen mittels des Fluoreszenzfarbstoffs PI, konfokalmikroskopisch untersucht. Das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Unbehandelt wiesen der Wildtyp und die *tdp2-1* Einzelmutante keine toten Zellen im Wurzelmeristem auf, wohingegen die *wss1A-3* Einzelmutante und die *tdp2-4 wss1A-3* Doppelmutante eine stark erhöhte Anzahl von 7 (*wss1A-3*) und 9 (*tdp2-4 wss1A-3*) toten Zellen pro Wurzel aufwiesen. Der Unterschied zwischen der *wss1A-3* und der *tdp2-4 wss1A-3* Linie war unbehandelt jedoch nicht signifikant. Die 24-stündige Behandlung mit 20 μM Eto bewirkte bei allen Mutantenlinien einen signifikanten Anstieg in der Anzahl toter Zellen, wohingegen im Wildtyp weiterhin keine toten Zellen detektierbar waren. Die *tdp2-1* Einzelmutante wies nach der Eto-Behandlung 3 tote Zellen auf und die *wss1A-3* Mutante zeigte durchschnittlich 11 tote Zellen. Die Doppelmutante wies mit 15 toten Zellen pro Wurzel, signifikant mehr tote Zellen als beide Einzelmutanten auf und zeigte somit einen synergistischen Effekt. Dies bedeutet, dass TDP2 und WSS1A in parallelen Wegen der TOP2cc Reparatur agieren. Die Rohdaten der Sensitivitätsanalyse können in Tabelle 8.16 im Anhang eingesehen werden.

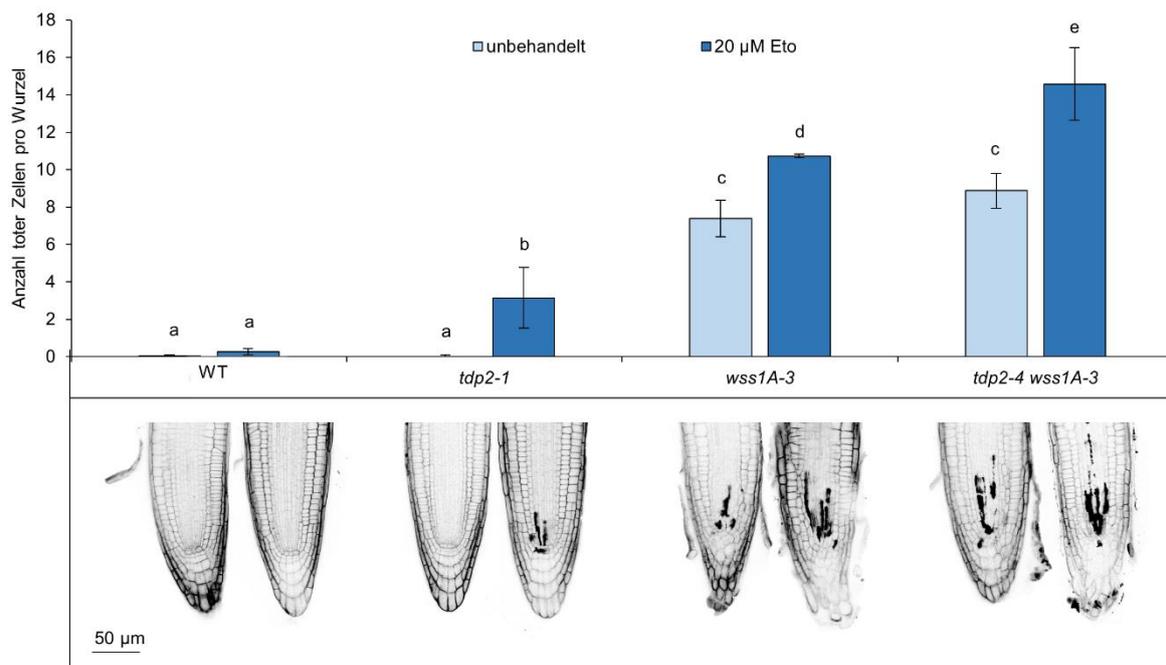


Abbildung 3.14: Etoposid Sensitivitätsanalyse der *tdp2 wss1A* Doppelmutante.

Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl toter Zellen im Wurzelmeristem von fünf Tage alten Keimlingen ($n=4$, $N=10$), mit je einer exemplarischen mit Propidiumiodid angefärbten Wurzel. Unbehandelt wiesen der Wildtyp (WT) und die *tdp2* Einzelmutante keine toten Zellen auf, während die *wss1A* Einzelmutante und die *tdp2 wss1A* Doppelmutante eine vergleichbar erhöhte Anzahl an toten Zellen zeigten. Nach 24 h Behandlung mit 20 μM Etoposid (Eto) wiesen alle Mutantenlinien eine Eto-spezifische signifikant erhöhte Anzahl an toten Zellen auf, während der WT weiterhin keine toten Zellen zeigte. Die *tdp2 wss1A* Doppelmutante wies zudem einen synergistischen Effekt, mit signifikant mehr toten Zellen als beide Einzelmutantenlinien, auf. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Bei der statistischen Analyse wurden sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Wurzeln des jeweiligen Genotyps miteinander verglichen, wie auch die gleich behandelten Wurzeln der verschiedenen Genotypen. Statistische Signifikanzen wurden mit der zweifaktoriellen ANOVA mit einem anschließenden Mehrfachvergleich mit Tukey's Post-Hoc errechnet: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

3.4 REPARATUR DES DSBS NACH DER ENTFERNUNG VON TOP2

Durch Sensitivitätsanalysen in *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass sowohl TDP2 als auch WSS1A an der Reparatur von TOP2cc beteiligt sind und dabei in unterschiedlichen Wegen agieren (Abschnitt 3.3.3). Da in Vertebraten und in Hefe bereits ähnliche Ergebnisse demonstriert wurden, scheint der Funktionsmechanismus der beiden Faktoren in Pflanzen konserviert zu sein (Cortes Ledesma *et al.*, 2009; Lopez-Mosqueda *et al.*, 2016; Serbyn *et al.*, 2020). Entsprechend ihrer enzymatischen Aktivität repariert TDP2 die TOP2ccs mutmaßlich durch die Hydrolyse der 5'-Phosphodiesterbindung zwischen TOP2 und der DNA, während WSS1A den Proteinpart des TOP2cc proteolytisch abbaut. Die Entfernung von TOP2 durch die beiden Reparaturfaktoren verhindert jedoch die Rückreaktion von TOP2, welche die Re-Ligation des zuvor induzierten Bruches bewirken würde. Dementsprechend bleibt nach der Entfernung von TOP2 ein Doppelstrangbruch (DSB) bestehen, der durch nachfolgende DSB-Reparaturmechanismen geschlossen werden muss. In Vertebraten konnte gezeigt werden, dass sowohl der klassische (cNHEJ) als auch der alternative (aNHEJ) *non-homologous end joining* (NHEJ) Weg an der Reparatur dieses DSBs beteiligt sind (Gómez-Herreros *et al.*, 2013; Chandramouly *et al.*, 2021). Um herauszufinden wie der jeweilige resultierende DSB nach der Entfernung von TOP2 durch TDP2 oder WSS1A anschließend repariert wird, wurden Doppelmutanten, mit je einem Defekt in einem TOP2cc Reparaturfaktor und einem weiteren Defekt in einem NHEJ Faktor, generiert und die jeweilige Interaktion mittels Epistasisanalysen untersucht.

3.4.1 Analyse der DSB Reparatur nach TDP2 vermittelter Hydrolyse

Analysen in Säugern zeigten, dass durch die TDP2 vermittelte Hydrolyse der 5'-Phosphodiesterbindung des TOP2cc ein sogenannter glatter DSB, mit einem 4 bp Überhang und je einem 5'-Phosphatrest und einer 3'-OH-Gruppe an den gegenüberliegenden Enden, generiert wird. In Säugern konnte weiterhin demonstriert werden, dass dieser glatte DSB durch den cNHEJ Weg fehlerfrei repariert werden kann (Gómez-Herreros *et al.*, 2013). DSBs werden in Pflanzen ebenfalls präferiert durch NHEJ Mechanismen repariert, wohingegen die Reparatur durch die Homologe Rekombination eher eine untergeordnete Rolle spielt (Puchta, 2005). Um zu untersuchen, wie der verbleibende DSB nach der TDP2 vermittelten *crosslink* Hydrolyse repariert wird, lag der Fokus daher auf den beiden NHEJ-Mechanismen: cNHEJ und aNHEJ.

3.4.1.1 Charakterisierung der *tdp2 lig4* Doppelmutante in der TOP2cc Reparatur

Um zu untersuchen ob der DSB nach der TDP2 vermittelten Entfernung von TOP2 durch den cNHEJ Weg repariert wird, wurde zunächst eine Doppelmutante mit einem simultanen Defekt in *TDP2* und in dem cNHEJ Faktor *LIG4* erzeugt. Hierfür wurden die entsprechenden Einzelmutantenlinien *tdp2-1* und *lig4-5* miteinander gekreuzt (Abschnitt 2.2.3.5). Nach Identifikation einer doppelt homozygoten Linie

in der F2-Generation, wurde das Saatgut der Doppelmutante weitervermehrt. Da der Fokus auf der DSB Reparatur nach der Entfernung von TOP2 lag, wurde die *tdp2-1 lig4-5* Doppelmutante einer Eto Sensitivitätsanalyse unterzogen, da Eto spezifisch das Intermediat des TOP2ccs stabilisiert. Hierfür wurde in den verschiedenen Genotypen die Zelltodrate von unbehandelten Wurzeln mit der von Wurzeln, die mit 20 μ M Eto behandelt wurden, verglichen (Abschnitt 2.2.3.9). Vor der konfokalmikroskopischen Untersuchung, wurden die toten Zellen in den Wurzelmeristem mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs PI sichtbar gemacht. Unbehandelt wiesen die *tdp2-1 lig4-5* Doppelmutante, die *tdp2-1* Einzelmutante und der Wildtyp keine toten Zellen pro Wurzel auf (Abbildung 3.15).

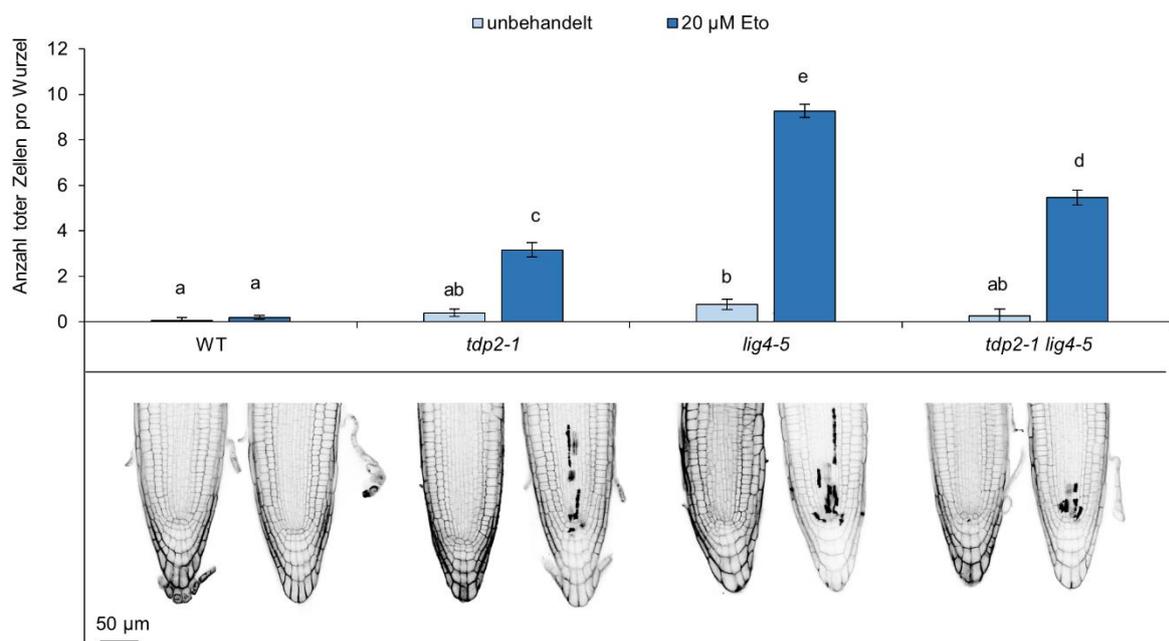


Abbildung 3.15: Etoposid Sensitivitätsanalyse der *tdp2 lig4* Doppelmutante.

Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl toter Zellen im Wurzelmeristem von fünf Tage alten Keimlingen ($n=3$, $N=10$), mit je einer exemplarischen mit Propidiumiodid angefärbten Wurzel. Unbehandelt wiesen der Wildtyp (WT), die *tdp2* Einzelmutante und die *tdp2 lig4* Doppelmutante keine toten Zellen auf, während die *lig4* Einzelmutante eine im Vergleich zum WT und zur *tdp2* Mutante signifikant erhöhte Anzahl toter Zellen aufwies. Nach 24 h Behandlung mit 20 μ M Etoposid (Eto) wiesen alle Mutantenlinien eine Eto-spezifische signifikant erhöhte Anzahl an toten Zellen auf, während der WT weiterhin keine toten Zellen zeigte. Die *lig4* Einzelmutante wies dabei signifikant mehr tote Zellen als die *tdp2* Einzelmutante und die *tdp2 lig4* Doppelmutante auf. Die *tdp2 lig4* Doppelmutante wies wiederum signifikant mehr tote Zellen als die *tdp2* Einzelmutante auf. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Bei der statistischen Analyse wurden sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Wurzeln des jeweiligen Genotyps miteinander verglichen, wie auch die gleich behandelten Wurzeln der verschiedenen Genotypen. Statistische Signifikanzen wurden mit der zweifaktoriellen ANOVA mit einem anschließenden Mehrfachvergleich mit Tukey's Post-Hoc errechnet: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

Lediglich die *lig4-5* Einzelmutante wies mit etwa einer toten Zelle pro Wurzel, eine signifikant erhöhte Anzahl an toten Zellen im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Behandlung mit 20 μ M Eto bewirkte einen signifikanten Anstieg an toten Zellen in allen Mutantenlinien. Die *lig4-5* Einzelmutante wies mit einer Anzahl von 10 toten Zellen eine signifikant stärkere Sensitivität gegen Eto auf, als die *tdp2-1* Einzelmutante (3 tote Zellen) und auch die *tdp2-1 lig4-5* Doppelmutante (5 tote Zellen). Während die *tdp2-1 lig4-5* Doppelmutante zwar signifikant weniger tote Zellen als die *lig4-5* Einzelmutante aufwies,

zeigte sie im Vergleich zur *tdp2-1* Mutante signifikant mehr tote Zellen pro Wurzel. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der DSB nach der TDP2 vermittelten *crosslink* Hydrolyse bevorzugt durch den cNHEJ Mechanismus geschlossen wird und auch, dass in Abwesenheit von TDP2 vermehrt andere DSB Reparaturmechanismen genutzt werden. Weiterhin scheint der cNHEJ Mechanismus auch unabhängig von TDP2 in die TOP2cc Reparatur involviert zu sein. Die Daten der Sensitivitätsanalyse können in Tabelle 8.17 im Anhang eingesehen werden.

3.4.1.2 Charakterisierung der *tdp2 teb* Doppelmutante in der Reparatur von TOP2cc

Analysen in Säugern zeigten, dass der fehlerbehaftete aNHEJ Weg ebenfalls in die Reparatur von TOP2cc involviert ist. Da humane Zellkulturen die sowohl einen Defekt in *TDP2* als auch in *POLQ* aufwiesen, einen synergistischen Effekt bei der Behandlung mit dem TOP2cc induzierenden Genotoxin Eto aufwiesen, wurde resümiert, dass TDP2 und aNHEJ in Säugern in unterschiedlichen Wegen der TOP2cc Reparatur agieren (Chandramouly *et al.*, 2021).

Um die genetische Interaktion von *TDP2* und *POLQ* in Pflanzen zu untersuchen, wurde eine Doppelmutante, durch Kreuzung der Einzelmutanten *tdp2-1* und *teb-5*, generiert (Abschnitt 2.2.3.5). Die in der F2-Generation identifizierte homozygote Doppelmutante *tdp2-1 teb-5*, wurde anschließend weitervermehrt. Zur Untersuchung der Interaktion der beiden Faktoren in der TOP2cc Reparatur, wurde eine Eto-Sensitivitätsanalyse, bei der die Anzahl toter Zellen in den Wurzelmeristemen der verschiedenen Genotypen ermittelt wurde, durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.9). Fünf Tage alte unbehandelte Wurzeln, wurden hierfür mit Wurzeln verglichen, die für jeweils 24 h mit 20 µM Eto behandelt wurden. Das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse ist in Abbildung 3.16 zu sehen. Während im Wildtyp und der *tdp2-1* Mutante im unbehandelten Zustand keine toten Zellen im Wurzelmeristem sichtbar waren, zeigten die *teb-5* Einzelmutante und die *tdp2-1 teb-5* Doppelmutante eine erhöhte Anzahl von 7 (*teb-5*) bzw. 8 (*tdp2-1 teb-5*) toten Zellen auf. Signifikante Unterschiede konnten in den beiden *POLQ* defizienten Linien im unbehandelten Zustand nicht festgestellt werden. Die Behandlung mit Eto bewirkte einen signifikanten Anstieg in der Anzahl toter Zellen in allen Mutantenlinien, während der Wildtyp weiterhin keine toten Zellen aufwies. Die *tdp2-1* Einzelmutante wies etwa 4 tote Zellen auf, bei der *teb-5* Einzelmutante waren durchschnittlich 12 tote Zellen zu sehen und die Doppelmutante wies mit durchschnittlich 16 toten Zellen einen synergistischen Effekt, mit signifikant mehr toten Zellen als beide Einzelmutanten auf. Dies bedeutet, dass TDP2 und aNHEJ bei der TOP2cc Reparatur in unterschiedlichen Wegen agieren. Die Rohdaten der Analyse können im Anhang in Tabelle 8.18 eingesehen werden.

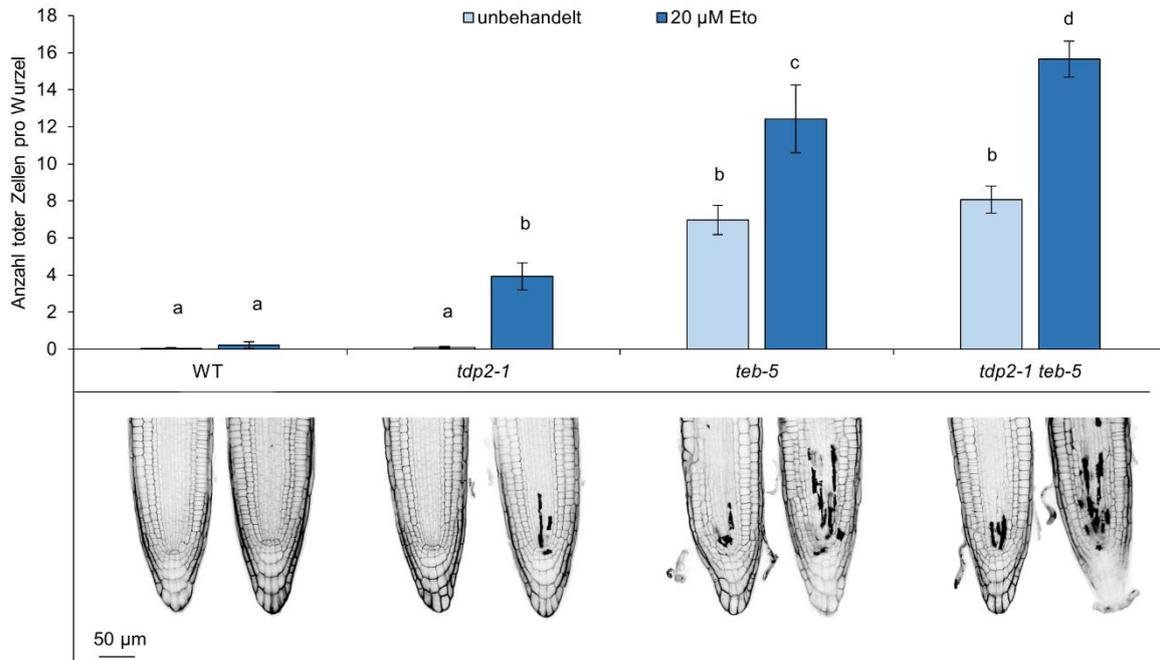


Abbildung 3.16: Etoposid Sensitivitätsanalyse der *tdp2 teb* Doppelmutante.

Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl toter Zellen, im Wurzelmeristem von fünf Tage alten Keimlingen ($n=4$, $N=10$), mit je einer exemplarischen mit Propidiumiodid angefärbten Wurzel. Unbehandelt wiesen der Wildtyp (WT) und die *tdp2* Einzelmutante keine toten Zellen auf, während die *teb-5* und die *tdp2-1 teb-5* Mutanten bereits eine signifikant erhöhte Anzahl toter Zellen zeigten. Die 24-stündige Behandlung mit 20 µM Etoposid (Eto) bewirkte in allen Mutantenlinien einen signifikanten Anstieg in der Anzahl toter Zellen, während der WT weiterhin keine toten Zellen zeigte. Die *tdp2-1 teb-5* Doppelmutante wies einen synergistischen Effekt mit signifikant mehr toten Zellen, als beide Einzelmutantenlinien auf. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Bei der statistischen Analyse wurden sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Wurzeln des jeweiligen Genotyps miteinander verglichen, wie auch die gleich behandelten Wurzeln der verschiedenen Genotypen. Statistische Signifikanzen wurden mit der zweifaktoriellen ANOVA mit einem anschließenden Mehrfachvergleich mit Tukey's Post-Hoc errechnet: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

3.4.2 Analyse der DSB Reparatur nach der Proteolyse von TOP2 durch WSS1A

Vorhergehende Analysen zeigten, dass in Arabidopsis sowohl cNHEJ, als auch aNHEJ, in der Reparatur des verbleibenden DSB, nach der Entfernung von TOP2 beteiligt sind (Abschnitt 3.4.1). Der cNHEJ-Mechanismus scheint dabei sowohl in einem gleichen Weg wie TDP2, als auch unabhängig von TDP2 zu agieren. Im Gegensatz dazu, deuteten die Ergebnisse der Sensitivitätsanalyse der *teb wss1A* Mutante darauf hin, dass der aNHEJ-Mechanismus in einem anderen Weg der TOP2cc-Reparatur beteiligt ist, als TDP2. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die DPC-Protease WSS1A ebenfalls parallel zu TDP2 in der TOP2cc Reparatur agiert (Abschnitt 3.3.3). Analysen in Hefe zeigten, dass nach der WSS1A vermittelten Degradation des Protein-Parts eines DPCs, eine Peptidrest an der DNA verbleibt, der entweder durch die Transläsionssynthese umgangen, oder durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) entfernt werden muss (Stingele *et al.*, 2014). In der Reparatur von TOP2cc verbleibt nach der Proteolyse von TOP2 durch WSS1A allerdings ein Peptidrest, der mit einem DSB verknüpft ist und deshalb nicht einfach durch die Transläsionssynthese umgangen werden kann. Wie dieser Schaden nachfolgend repariert wird und welche DSB Reparaturmechanismen daran beteiligt sind, ist noch unbekannt. Da

sowohl cNHEJ, als auch aNHEJ unabhängig von TDP2 in der TOP2cc Reparatur fungieren können, könnten auch beide DSB-Reparaturmechanismen in der DSB-Reparatur nach der WSS1A vermittelten Proteolyse von TOP2 involviert sein. Um die Interaktion der verschiedenen Reparaturmechanismen zu überprüfen, wurden im Folgenden Epistasis Analysen mit entsprechenden Doppelmutantenlinien durchgeführt.

3.4.2.1 Charakterisierung der *wss1A lig4* Doppelmutante in der Reparatur von TOP2cc

Da der cNHEJ Mechanismus in mehreren Wegen der TOP2cc Reparatur involviert zu sein scheint, sollte überprüft werden, ob der DSB nach der WSS1A vermittelten Proteolyse von TOP2, ebenfalls durch cNHEJ geschlossen werden kann. Hierfür wurde mittels Kreuzung der entsprechenden homozygoten Einzelmutanten eine *lig4-5 wss1A-3* Doppelmutante generiert, die in der F2- Generation durch die PCR-vermittelte Genotypisierung der Pflanzen identifiziert werden konnte (Abschnitt 2.2.3.5). Die *lig4-5 wss1A-3* Doppelmutante wurde im Folgenden auf ihren Wuchstyp und auf ihre Wurzellänge untersucht. Hinsichtlich des Wuchstyps waren keine Unterschiede sichtbar, doch die *lig4-5 wss1A-3* Doppelmutante wies im Vergleich beider Einzelmutantenlinien und zum Wildtyp eine signifikant reduzierte Wurzellänge auf (Anhang Abbildung 8.1). Um zu untersuchen, wie die beiden Faktoren in der TOP2cc Reparatur miteinander interagieren, wurde eine Eto-Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Nach Färbung mit PI, wurde hierfür die Anzahl toter Zellen, in den Wurzeln fünf Tage alter Keimlinge, durch konfokalmikroskopische Untersuchung bestimmt (Abschnitt 2.2.3.9). Zur Evaluierung der Sensitivität gegen Eto, wurde die Anzahl toter Zellen der mit 20 µM Eto behandelten Wurzeln, mit der Anzahl toter Zellen von unbehandelten Wurzeln des jeweiligen Genotyps verglichen. Das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Bereits im unbehandelten Zustand, wiesen die Wurzeln der Mutantenlinien alle einen signifikanten Unterschied in der Anzahl toter Zellen im Vergleich zum Wildtyp auf, welcher keine toten Zellen zeigte. Die *lig4-5* Mutante wies durchschnittlich etwa eine tote Zelle pro Wurzel auf. Die Doppelmutante und die *wss1A-3* Mutanten wiesen dagegen mit etwa 5 (*wss1A-3*) und 6 toten Zellen (*lig4-5 wss1A-3*), ein vergleichbares Level an toten Zellen auf, welches sich signifikant von der *lig4-5* Mutante unterschied. Die Behandlung mit Eto bewirkte in allen Mutanten einen weiteren Anstieg in der Anzahl toter Zellen, während der Wildtyp weiterhin keine toten Zellen zeigte. Die *lig4-5* und die *wss1A-3* Einzelmutanten wiesen nach der Induktion mit Eto ein vergleichbares Level von durchschnittlich 9 toten Zellen pro Wurzel auf. Die *lig4-5 wss1A-3* Doppelmutante dagegen, zeigte mit etwa 12 toten Zellen pro Wurzel einen synergistischen Effekt, mit signifikant mehr toten Zellen als beide Einzelmutanten. Damit konnte gezeigt werden, dass WSS1A und der cNHEJ Mechanismus in verschiedenen Wegen der TOP2cc Reparatur involviert sind. Die Rohdaten der Sensitivitätsanalyse können in Tabelle 8.19 im Anhang eingesehen werden.

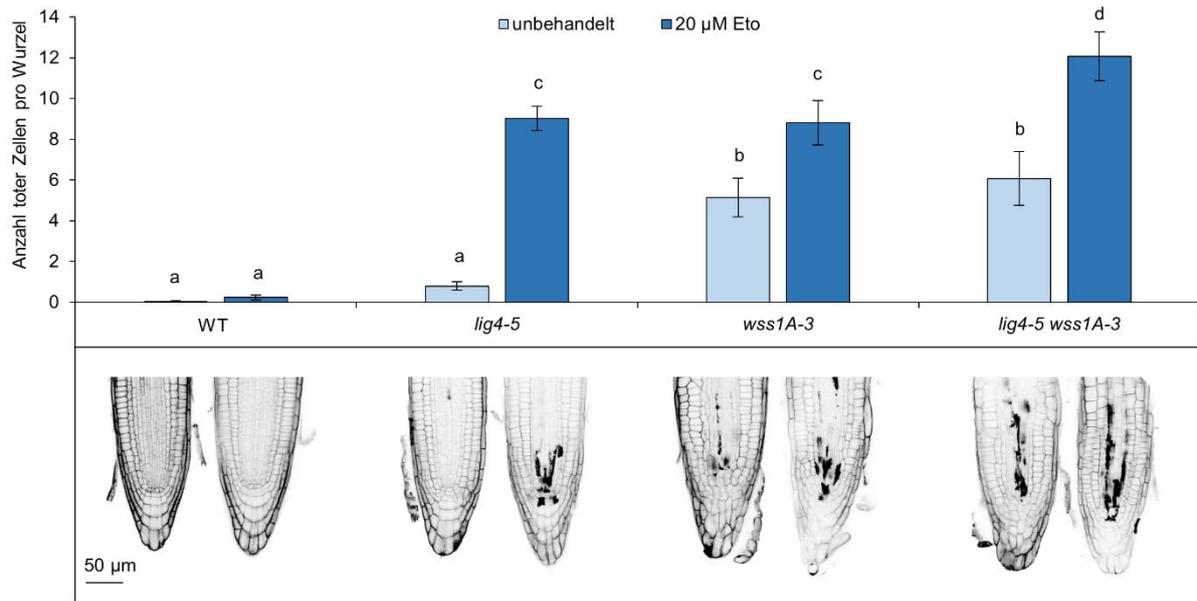


Abbildung 3.17: Etoposid Sensitivitätsanalyse der *lig4 wss1A* Doppelmutante.

Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl toter Zellen, im Wurzelmeristem von fünf Tage alten Keimlingen ($n=3$, $N=10$), mit je einer exemplarischen mit Propidiumiodid angefärbten Wurzel. Unbehandelt wies der Wildtyp (WT) keine toten Zellen auf, während die *lig4* Mutante bereits eine leicht erhöhte Anzahl an toten Zellen aufwies, die sich signifikant vom WT unterschied. Die *wss1A* und die *lig4 wss1A* Mutanten zeigten ein vergleichbares Level an toten Zellen, welches signifikant höher als das des WT und der *lig4* Mutante war. Die 24-stündige Behandlung mit 20 µM Etoposid (Eto) bewirkte in allen Mutantenlinien einen signifikanten Anstieg in der Anzahl toter Zellen, während der WT weiterhin keine toten Zellen zeigte. Während die *lig4* und die *wss1A* Einzelmutanten nun ein vergleichbares Level an toten Zellen aufwiesen, wies die Doppelmutante eine stärkere Sensitivität gegen Eto, mit signifikant mehr toten Zellen, als beide Einzelmutanten auf. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Bei der statistischen Analyse wurden sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Wurzeln des jeweiligen Genotyps miteinander verglichen, wie auch die gleich behandelten Wurzeln der verschiedenen Genotypen. Statistische Signifikanzen wurden mit der zweifaktoriellen ANOVA mit einem anschließenden Mehrfachvergleich mit Tukey's Post-Hoc errechnet: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

3.4.2.2 Charakterisierung der *teb wss1A* Doppelmutante

Sowohl für die DPC-Protease WSS1A, als auch für den aNHEJ Faktor POLQ konnte nachgewiesen werden, dass sie unabhängig von TDP2 in die TOP2cc Reparatur involviert sind (Abschnitt 3.3.3 und 3.4.1.2). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der verbleibende DSB nach der WSS1A vermittelten Entfernung von TOP2 vermutlich nicht, oder nur zu einem kleineren Anteil durch den cNHEJ Mechanismus geschlossen wird (Abschnitt 3.4.2.1). Um zu überprüfen ob WSS1A und aNHEJ in einem gemeinsamen Weg der TOP2cc Reparatur agieren, wurde eine Doppelmutante mit einer simultanen Mutation in sowohl WSS1A, als auch dem aNHEJ Faktor POLQ, generiert. Hierfür wurde die homozygote *wss1A-3* Einzelmutante mit der homozygoten *teb-5* Einzelmutante gekreuzt (Abschnitt 2.2.3.5). In der F2-Generation konnte bei der Genotypisierung von 40 Pflanzen keine Doppelmutante auffindig gemacht werden. Aus diesem Grund wurde eine Doppelmutante weitervermehrt, die bereits homozygot in *wss1A-3*, aber noch heterozygot in *teb-5* war. Nach der erneuten Genotypisierung von 40 Pflanzen in der F3-Generation konnte schließlich eine Pflanze identifiziert werden, die in beiden Faktoren eine homozygote Mutation aufwies. Diese wurde für weitere Analysen im Gewächshaus bis zur Samenreife weitervermehrt. Anschließend sollte der Wuchsphänotyp der neu generierten *teb-5*

wss1A-3 Mutantenlinien analysiert werden. Hierfür wurde das Saatgut der zu untersuchenden Genotypen zeitgleich in Erde ausgebracht. Während sowohl der Wildtyp, als auch die beiden Einzelmutantenlinien in Erde anwachsen, war auch nach drei Wochen der Kultivierung im Gewächshaus kein einziger Keimling von der *teb-5 wss1A-3* Doppelmutante sichtbar. Bei einem weiteren Versuch wurden daher je 52 Samen jedes Genotyps auf einer Platte mit GM-Festmedium ausgesät und axenisch für zwei Wochen kultiviert. Beim Wildtyp keimten innerhalb dieser Zeit alle ausgesäten Samen aus. Die *wss1A-3* und die *teb-5* Einzelmutanten wiesen bereits leicht reduzierte Keimungsraten von 81 % (*teb-5*, 42 von 52 Samen gekeimt) und 71 % (*wss1A-3*, 37 von 52 Samen gekeimt) auf. Etwa die Hälfte der Keimlinge der *wss1A-3* Mutante wies einen auffälligen Phänotyp, mit einer reduzierten Keimlingsgröße oder gelblichen Blätter, auf. Im Vergleich zum Wildtyp und zu beiden Einzelmutanten war die Keimungsrate der Doppelmutante mit 8 % (4 von 52 Samen gekeimt) auffällig niedrig. Die wenigen gewachsenen Keimlinge wiesen alle einen auffälligen Phänotyp, mit einer reduzierten Wuchsgröße, oder einer gelblich bis bräunlichen Verfärbung der Blätter, auf. Zur weiteren Analyse des Wuchsphänotyps wurden die Keimlinge in Erde transferiert und für weitere drei Wochen im Gewächshaus kultiviert. Bereits die *teb-5* und die *wss1A-3* Einzelmutanten wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Wuchshöhe auf. Die *teb-5 wss1A-3* Doppelmutante wies im Vergleich zu beiden Einzelmutanten jedoch ein noch stärker reduziertes Größenwachstum auf und erschien insgesamt fragiler zu sein.

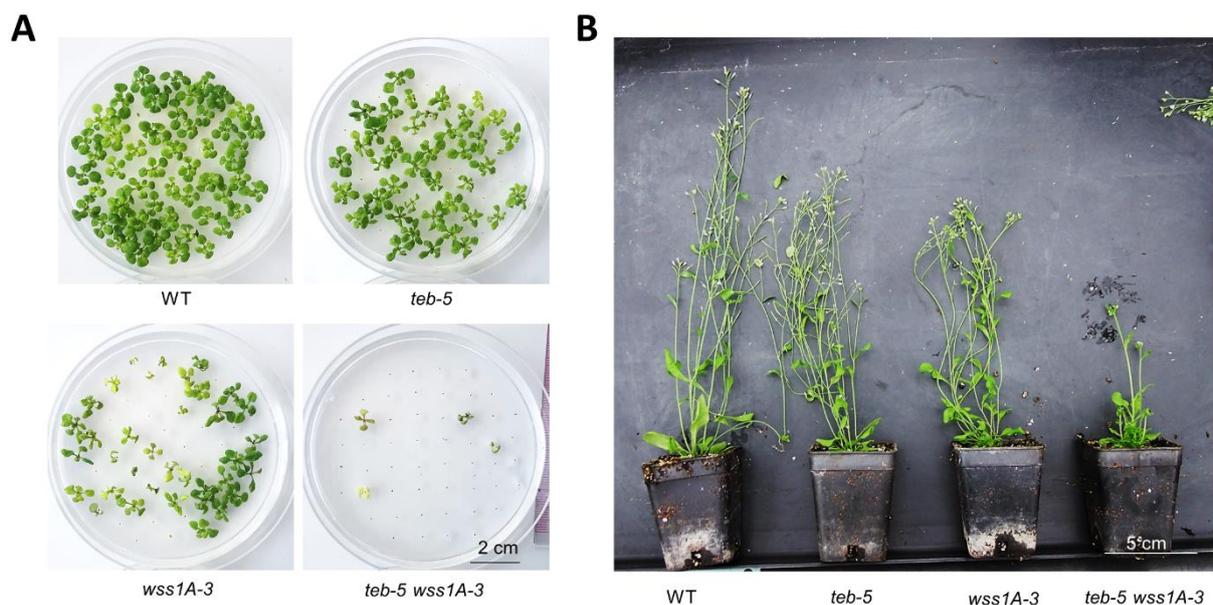


Abbildung 3.18: Wuchsphänotyp der *teb wss1A* Doppelmutante.

A) Dargestellt ist der Wuchsphänotyp von je 52 Keimlinge nach zweiwöchiger axenischer Kultivierung. Beim Wildtyp (WT) keimten alle ausgesäten Samen aus, während die *teb* und die *wss1A* Einzelmutante bereits eine etwas verringerte Keimungsrate aufwiesen. Bei der Doppelmutante keimten auffällig wenige Samen aus und die wenigen Keimlinge wiesen eine reduzierte Wuchsgröße und braune Blätter auf. **B)** Dargestellt ist der Wuchsphänotyp von fünf Wochen alten Pflanzen, nach zweiwöchiger axenischer Kultivierung und anschließender Kultivierung in Erde. Während das Größenwachstum der *teb* und der *wss1A* Einzelmutanten im Vergleich zum WT nur leicht reduziert war, zeigte die Doppelmutante eine stark reduzierte Wuchshöhe auf.

Zur Quantifizierung der Wachstumsdefizite wurde anschließend eine Wurzellängenanalyse durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.8). Die Samen der verschiedenen Genotypen wurden hierfür unter sterilen Bedingungen auf GM-Festmedium ausgebracht und für neun Tage vertikal kultiviert. Die Wurzeln der Keimlinge wurden anschließend fotodokumentiert und die Wurzellänge mittels des SmartRoot Plugins von ImageJ ausgewertet. Das Ergebnis der Wurzellängenanalyse ist in Abbildung 3.19 A dargestellt.

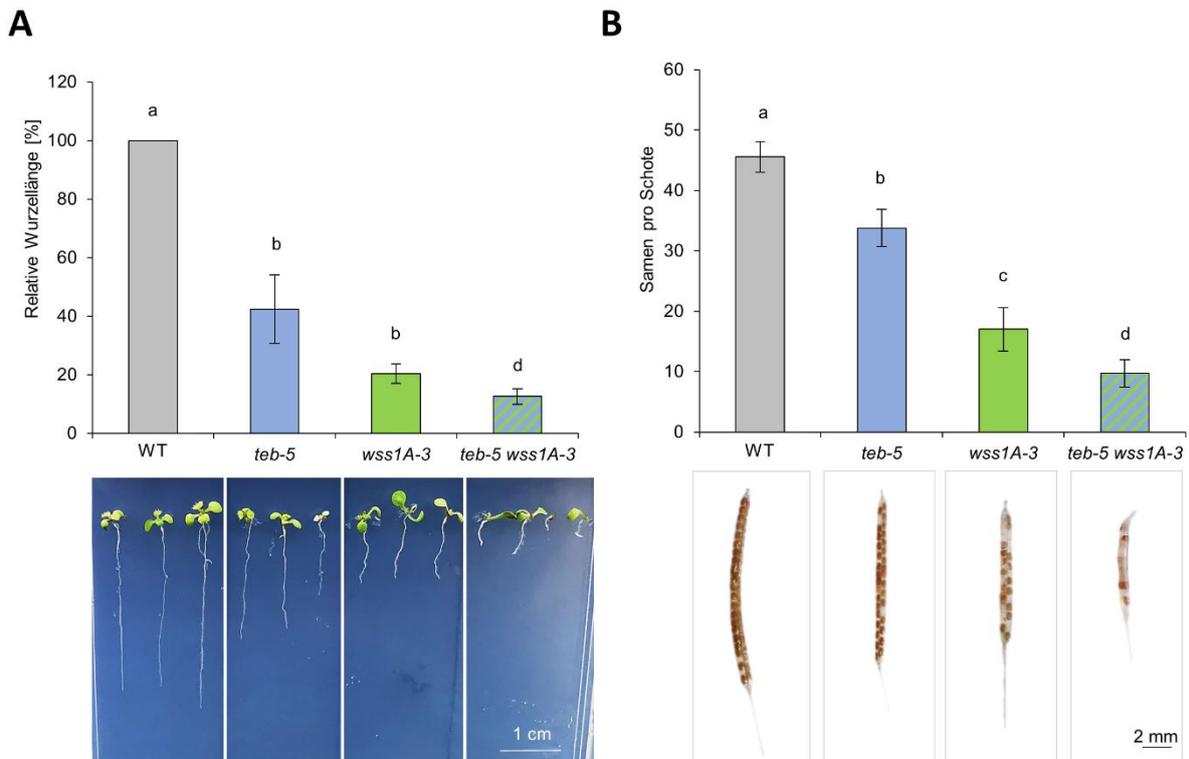


Abbildung 3.19: Wurzellänge und Fertilität der *teb wss1A* Doppelmutante

A) Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Wurzellänge von Keimlingen der verschiedenen Genotypen nach neun Tagen aufrechter axenischer Anzucht ($n=3$, $N=10$), mit je drei bis vier exemplarischen Wurzeln pro Genotyp. Die *teb* und die *wss1A* Einzelmutante wiesen eine signifikante reduzierte Wurzellänge auf einem ähnlichen Niveau auf, die sich in beiden Fällen signifikant von der Wurzellänge des Wildtyps (WT) unterschied. Die Doppelmutante wies nochmals signifikant kürzere Wurzeln als beide Einzelmutanten auf. **B)** Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl der Samen pro Schote der verschiedenen Genotypen ($n=5$, $N=5$). Die *teb* Einzelmutante wies signifikant weniger Samen als der WT auf. Die *wss1A* Mutante zeigte im Vergleich zur *teb* Mutante eine signifikant stärker reduzierte Fertilität und die Doppelmutante wies im Vergleich zu beiden Einzelmutanten eine signifikant noch stärkere verminderte Fertilität auf. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Statistische Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen T-Test mit ungleicher Varianz ermittelt: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der Versuchsansätze, N = Anzahl der Wurzeln pro Versuchsansatz.

Die *teb-5* und die *wss1A-3* Einzelmutante wiesen mit einer relativen Wurzellänge von entsprechend 42 % und 22 % eine signifikant reduzierte Wurzellänge im Vergleich zum Wildtyp auf. Zwischen den beiden Einzelmutanten bestand kein signifikanter Unterschied. Die Doppelmutante wies mit einer relativen Wurzellänge von 10 % nochmals signifikant kürzere Wurzeln als die beiden Einzelmutanten auf. Die Rohdaten können in Tabelle 8.20 im Anhang eingesehen werden.

Da bei der Analyse des Wuchsphänotyps bereits auffiel, dass die Doppelmutante eine drastisch reduzierte Keimungsrate aufweist, wurde weiterhin eine Fertilitätsanalyse durchgeführt (Abschnitt

2.2.3.7). Hierfür wurden die verschiedenen Genotypen im Gewächshaus bis zur Samenreife kultiviert und anschließend von fünf Pflanzen jedes Genotyps je fünf Schoten abgenommen und in ein Gefäß mit Ethanol transferiert. Am nächsten Tag konnten die Samen innerhalb der einzelnen Schoten mithilfe eines Binokulars ausgezählt werden. Das Ergebnis der Fertilitätsanalyse ist in Abbildung 3.19 B dargestellt. Der Wildtyp wies durchschnittlich 46 Samen pro Schote auf, wohingegen die *teb-5* Einzelmutante mit 34 Samen pro Schote bereits eine signifikant reduzierte Anzahl an Samen, im Vergleich zum Wildtyp, aufwies. Die *wss1A-3* Einzelmutante zeigte mit nur durchschnittlich 17 Samen pro Schote eine stärker verminderte Fertilität und unterschied sich dadurch auch signifikant von der *teb-5* Einzelmutante. Die Doppelmutante wies mit nur 10 Samen pro Schote eine nochmals drastischer reduzierte Fertilität, als beide Einzelmutanten auf. Zusätzlich fiel auf, dass ein großer Anteil der wenigen Samen der Doppelmutante deformiert und dunkel waren. Die Rohdaten der Fertilitätsanalyse können in Tabelle 8.21 im Anhang eingesehen werden.

Defekte in der Fertilität basieren oftmals auf Schwierigkeiten in der Progression meiotischer Zellteilungen. Zur Analyse der *teb-5 wss1A-3* Doppelmutante auf potentielle meiotische Defekte, wurden eine Chromatinpräparation von männlichen Meiozyten durchgeführt (Abschnitt 2.2.3.6). Nach Anfärbung des Chromatins mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, konnten die verschiedenen Meiosestadien mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht werden. In der Meiose konnte bei der *teb-5 wss1A-3* Doppelmutante jedoch keine meiotischen Defekte festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Da Meiozyten in Pflanzen aus somatischen Zellen entstehen, könnte die verminderte Fertilität auch auf prämeiotische Replikationsdefekte zurückzuführen sein (Wang und Tseng, 2014). Um die *teb-5 wss1A-3* Doppelmutante auf Defekte in der mitotischen Zellteilung zu untersuchen, wurde, analog zur Untersuchung der Meiozyten, eine Chromatinpräparation durchgeführt. Die Blütenstände der verschiedenen Genotypen wurden zunächst fixiert und die DNA nach der anschließenden Chromatinpräparation mit DAPI angefärbt. Statt der Meiozyten wurden nun die somatischen Anaphasen auf Defekte analysiert. Dabei kann zwischen zwei unterschiedlichen Klassen an Defekten in somatischen Anaphasen unterschieden werden: Anaphasebrücken sind unvollständig getrennte Chromosomen, während chromosomale Fragmentierungen DNA-Brüche darstellen. Zum Vergleich wurden sowohl die Anaphasen der entsprechenden Einzelmutanten und des Wildtyps, als auch die der *lig4-5* Einzelmutante und der *lig4-5 wss1A-3* Doppelmutante untersucht und ausgewertet. Da der cNHEJ Mechanismus den Hauptweg für die Reparatur von DSB darstellt und weiterhin gezeigt werden konnte, dass er parallel zu WSS1A in der TOP2cc Reparatur agiert, hätte vermutet werden können, dass der simultane Verlust von LIG4 und WSS1A zu ähnlichen bis stärkeren Entwicklungsdefiziten führt. Die *lig4-5 wss1A-3* Doppelmutante wies jedoch einen Wuchsphänotyp und eine Keimungsrate auf, welche der *wss1A-3* Mutante entsprach und zeigte lediglich signifikant kürzere Wurzeln als die *wss1A-3* Mutante (Anhang Abbildung 8.1 A und B). Bei der Untersuchung der Anaphasen der verschiedenen Doppelmutanten sollten diese phänotypischen Unterschiede auf zellulärer Ebene untersucht werden. Von jedem Genotyp wurden mindestens 221 somatische Anaphasen untersucht. Statistische signifikante

Unterschiede zwischen den einzelnen Linien wurden anschließend mit dem zweiseitigen exakten Test nach Fisher berechnet. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

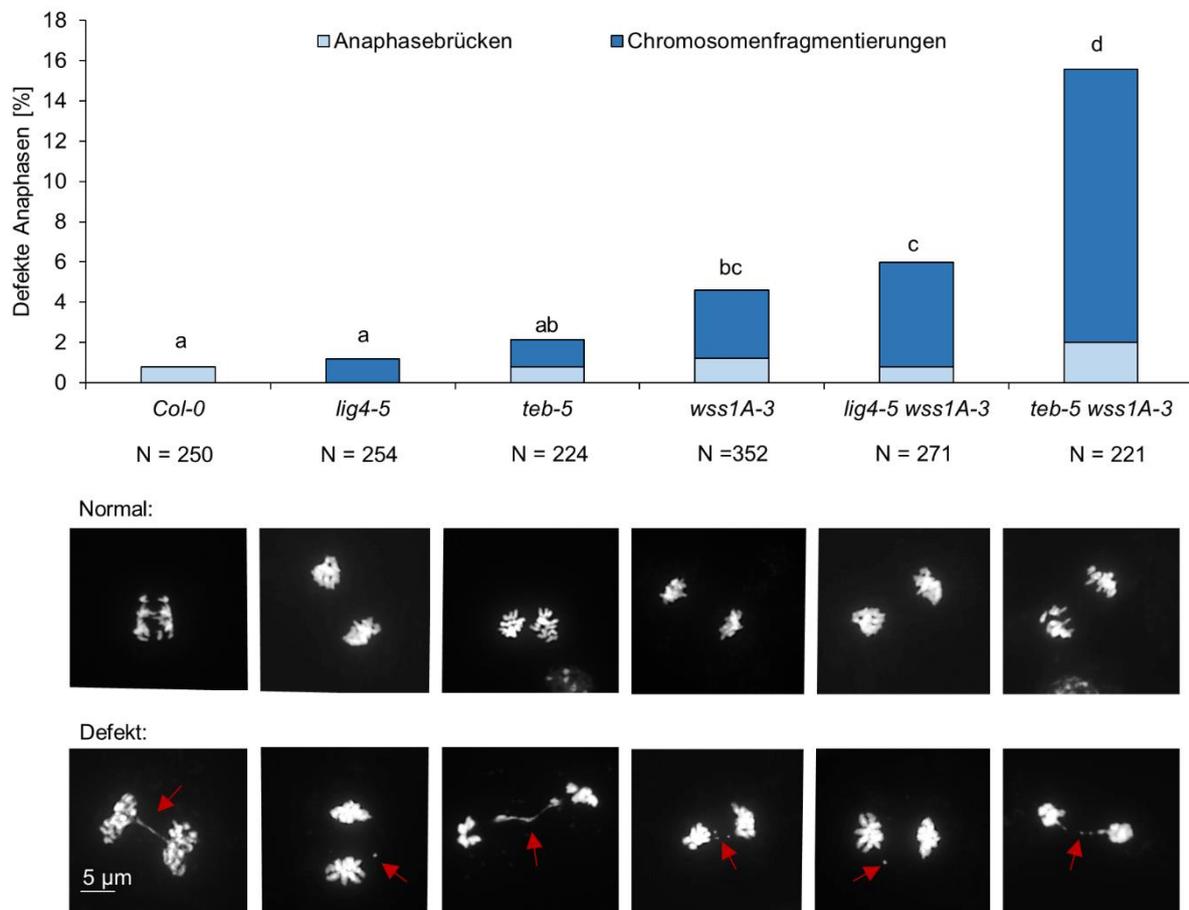


Abbildung 3.20: Analyse somatischer Anaphasen von *teb wss1A* und *lig4 wss1A*

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung defekter somatischer Anaphasen, mit je einem exemplarischen Bild einer normalen und einer defekten Anaphase je Genotyp. Für die Quantifizierung der Anaphasendefekte, wurden Chromatinpräparationen aus den Knospen vier Wochen alter Pflanzen durchgeführt und nach Färbung mit DAPI fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Defekte somatische Anaphasen wurden weiterhin unterteilt in Anaphasen mit Anaphasebrücken und Anaphasen mit Chromosomenfragmentationen. Die *lig4* und die *teb* Einzelmutante wiesen ein ähnliches Niveau an defekten Anaphasen wie der Wildtyp (WT) auf. Die *wss1A* Einzelmutante dagegen wies signifikant mehr defekte Anaphasen als der WT und die *lig4* Mutante auf. Die *lig4 wss1A* Doppelmutante zeigte ein ähnliches Level von defekten Anaphasen auf wie die *wss1A* Mutante. Es konnte jedoch eine Verschiebung in der Verteilung der Defekte beobachtet werden, da die *wss1A* Mutante im Vergleich zur *lig4 wss1A* Doppelmutante doppelt so viele Anaphasenbrücken zeigte. Die *teb wss1A* Doppelmutante zeigte signifikant mehr defekte Anaphasen als alle anderen Mutantenlinien. Etwa 15 % aller somatischen Anaphasen von *teb wss1A* wiesen chromosomale Aberrationen auf. Die Verteilung der Defekte war jedoch vergleichbar mit der *lig4 wss1A* Doppelmutantenlinie. Statistische Unterschiede wurden mit einem zweiseitigen exakten Test von Fisher berechnet: $a \neq b$ wenn $p < 0,05$

Der Wildtyp und die *lig4-5* Einzelmutante wiesen nur einen sehr geringen Anteil an defekten Anaphasen (Wildtyp: 0,8 %; *lig4-5*: 1,2 %) auf. Die Verteilung der jeweiligen Defekte unterschied sich jedoch. Während beim Wildtyp nur Anaphasebrücken, unvollständig getrennte Chromosomen, detektiert werden konnten, wies die *lig4-5* Einzelmutante Chromosomenfragmentationen auf. Die *teb-5* Einzelmutante wies etwas mehr Defekte (2,1 %) als die *lig4-5* Mutante und der Wildtyp auf, unterschied sich dabei jedoch nicht signifikant. Überraschenderweise zeigte die *wss1A-3* Einzelmutante eine

signifikant erhöhte Anzahl an defekten Anaphasen (4,5 %) im Vergleich zum Wildtyp und zur *lig4-5* Mutante. Die Anzahl der defekten Anaphasen mit Anaphasenbrücken, war vergleichbar mit dem Wildtyp, der Hauptunterschied bestand in der Anzahl an defekten Anaphasen mit chromosomalen Fragmentierungen, welche 74 % der Defekte ausmachten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in der *wss1A-3* Mutante vermehrt DSB entstehen. Bei der *lig4-5 wss1A-3* Doppelmutante konnten noch etwas mehr defekte Anaphasen (6,0 %) als bei der *wss1A-3* Mutante detektiert werden, die Gesamtanzahl der defekten Anaphasen unterschied sich jedoch nicht signifikant von der *wss1A-3* Linie. Es konnte allerdings eine leichte Verschiebung in der Art der Defekte beobachtet werden, denn die *lig4-5 wss1A-3* Doppelmutante wies nur halb so viele Anaphasenbrücken (13 %) auf, wie die *wss1A-3* Mutante. Im Gegensatz zur *lig4-5 wss1A-3* Doppelmutante, zeigte die *teb-5 wss1A-3* Doppelmutante im Vergleich zu allen anderen Mutantenlinien und zum Wildtyp eine signifikant erhöhte Anzahl von Anaphasendefekten. Etwa 15 % aller gezählten somatischen Anaphasen der *teb-5 wss1A-3* Linie wiesen Chromosomenaberrationen auf. Die Verteilung der Art der Defekte (13 % Anaphasebrücken und 87 % Chromosomenfragmentierungen) lag jedoch auf einem vergleichbaren Niveau wie bei der *lig4-5 wss1A-3* Doppelmutantenlinie. Das bedeutet, dass der aNHEJ Weg in Abwesenheit von WSS1A eine wichtige Rolle in der Reparatur von replikativen DSB einnimmt. Die Rohdaten der Analyse sind im Anhang in Tabelle 8.22 ersichtlich.

Aufgrund der starken morphologischen Defekte, konnte die *teb-5 wss1A-3* Doppelmutante keinen Sensitivitätsanalysen unterzogen werden. Um dennoch einen Einblick in die Interaktion von POLQ mit Faktoren der DPC-Reparatur zu erhalten, wurde eine *mus81 teb* Doppelmutante einer CPT-Sensitivitätsanalyse unterzogen, da MUS81 parallel zu WSS1A in der TOP1cc Reparatur agiert. Bei der Reparatur von TOP1cc durch MUS81 wird postuliert, dass MUS81 an der Replikationsgabel einen einseitigen DSB erzeugt der durch nachfolgende DSB-Reparaturmechanismen wieder geschlossen werden muss. Es ist jedoch noch nicht bekannt durch welchen Mechanismus der DSB bei der MUS81 vermittelten TOP1cc Reparatur wieder repariert wird. Für die Analyse wurde eine *mus81-1 teb-7* Doppelmutante verwendet, die gruppenintern durch Cas9 vermittelte Mutagenese generiert wurde (Feller, 2021). Zur Analyse der Interaktion von POLQ und MUS81 in der TOP1cc-Reparatur, wurden die zu vergleichenden Linien auf GM-Festmedium ausgebracht und eine Woche später in CPT-haltiges GM-Flüssigmedium transferiert (Konzentrationen: 150 nM, 300 nM). Zur Ermittlung des relativen Frischgewichts wurden je zwei Proben jeder Linie nicht mit CPT behandelt. Das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse ist in Abbildung 3.21 als Balkendiagramm dargestellt. Bereits bei einer Konzentration von 150 nM CPT wiesen die *mus81-1*, die *teb-5* und die *mus81-1 teb-7* Mutanten ein um mehr als die Hälfte reduziertes relatives Frischgewicht (29 %, 34 % und 32 %, entsprechend) im Vergleich zu Wildtyp (84 %) auf. Zwischen den einzelnen Mutantenlinien bestanden keine signifikanten Unterschiede. Während der Wildtyp bei einer Konzentration von 300 nM CPT noch ein relatives Frischgewicht von 58 % aufwies, wies die *mus81-1* Mutante nur noch 20 %, die *teb-5* Mutante 31 % und die Doppelmutante 25 % ihres Ursprungsgewichts auf. Auch hier bestanden keine signifikanten

Unterschiede zwischen den einzelnen Mutantenlinien. Dies bedeutet, dass MUS81 und POLQ in einem gemeinsamen Weg der TOP1cc Reparatur agieren. Die Rohdaten der Sensitivitätsanalyse können Tabelle 8.23 im Anhang entnommen werden.

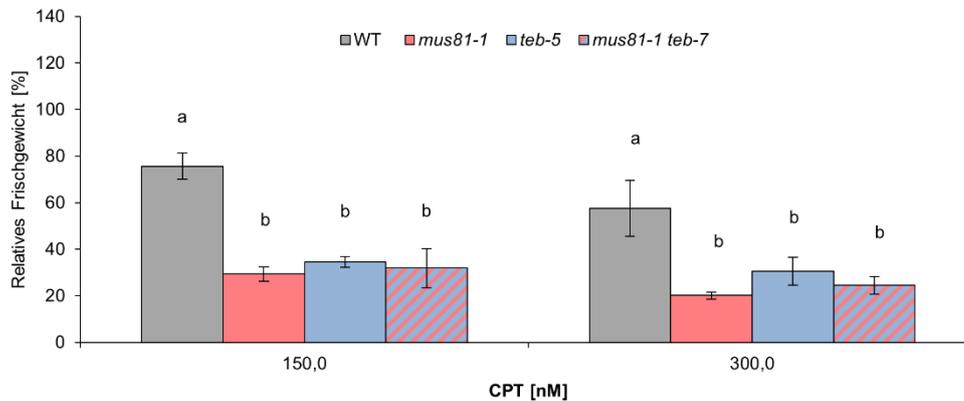


Abbildung 3.21: CPT Sensitivitätsanalyse der *teb mus81* Doppelmutante.

Dargestellt ist der Mittelwert des relativen Frischgewichts von je zehn Pflanzen nach 13-tägiger Behandlung mit verschiedenen CPT-Konzentrationen ($n=3$). Die *mus81*, die *teb* und die *mus81 teb* Mutanten wiesen sowohl bei 150, als auch bei 300 nM CPT ein vergleichbares relatives Frischgewicht auf, welches im Vergleich zum Wildtyp (WT) signifikant reduziert war. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Statistische Signifikanzen innerhalb der einzelnen CPT-Konzentrationen wurden mithilfe der einfaktoriellen ANOVA, mit nachfolgendem Mehrfachvergleich der verschiedenen Mutanten mittels Tukey's Post-Hoc, ermittelt: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$.

3.5 UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION VON WSS1A MIT FAKTOREN DES RTR-KOMPLEXES

Bei der Analyse von somatischen Anaphasen konnte festgestellt werden, dass die *wss1A-3* Mutante eine signifikant erhöhte Anzahl an defekten somatischen Anaphasen mit chromosomalen Fragmentierungen aufwies. Diese sind ein Hinweis auf unzureichend reparierte DSB, die während der Replikation entstehen. Um die Funktion von WSS1A bei der Replikation genauer zu untersuchen, sollte die genetische Interaktion mit dem RTR-Komplex Partner RECQ4A untersucht werden. Die Helikase RECQ4A trägt durch ihre Fähigkeit zur Regression von Replikationsgabeln einen wichtigen Anteil zur Aufrechterhaltung der Replikation, und damit zur Genomstabilität, bei (Schöpfer *et al.*, 2014b). Zur Untersuchung der Interaktion sollte durch Kreuzung der *wss1A-3* und der *recq4A-4* Einzelmutanten eine Doppelmutante generiert werden. Zur Identifizierung der Doppelmutante, wurden in der F2-Generation 100 Pflanzen genotypisiert. Es befand sich jedoch keine einzige homozygote Doppelmutante darunter. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen in der nächsten Generation eine homozygote Doppelmutante zu finden, wurden Pflanzen weiteretabliert, die homozygot in *recq4A-4* aber noch heterozygot in *wss1A-3* waren. In der F3-Generation wurden schließlich 80 Pflanzen genotypisiert, einschließlich aller kleinen, sehr schlecht wachsenden Pflanzen die sich auf der Platte mit GM-Festmedium befanden. Doch obwohl gemäß den Regeln der mendelschen Segregation etwa ein Viertel der Pflanzen homozygot mutiert in beiden Genen sein sollte, konnte auch in dieser Generation keine homozygote Doppelmutante identifiziert werden. Da dies auf eine Embryoletalität der Doppelmutante hinwies, wurden die

Embryonen der heterozygoten *recq4A-1 -/- wss1A-3 +/-* Doppelmutante, im Vergleich zu den beiden Einzelmutanten und zum Wildtyp untersucht (Abschnitt 2.2.3.10). Pro Genotyp wurden hierfür je zehn große, noch unreife Schoten geöffnet und die Vitalität der darin enthaltenen, noch unreifen Samen analysiert. Die Hülle der unreifen Arabidopsis Samen ist noch durchsichtig und ermöglicht dadurch eine Sicht auf den Embryo. In den größeren unreifen Arabidopsis Schoten, sollte ein gesunder Samen einen großen, weit angereiften Embryo mit zwei grünen Keimblättern enthalten (Boscá *et al.*, 2011). Durchsichtige und braune Samen sind dagegen ein Zeichen dafür, dass der Embryo nicht richtig heranreifen konnte. Das Ergebnis dieser Embryonenanalyse ist in Abbildung 3.22 dargestellt.

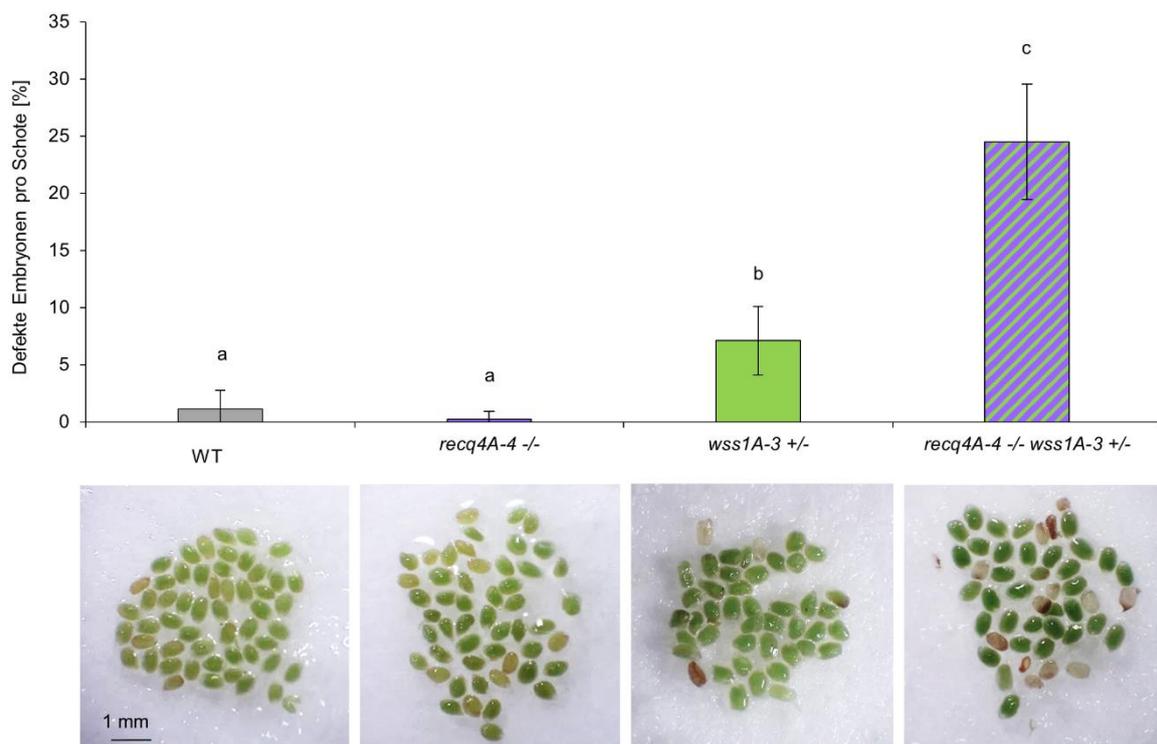


Abbildung 3.22: Embryonenanalyse der heterozygoten *recq4A wss1A* Doppelmutante

Dargestellt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils an defekten Samen von je zehn großen, unreifen Schoten jedes Genotyps. Samen mit vitalen Embryonen sind grün, während weiße und bräunliche Samen auf unentwickelte, oder fehlerhafte entwickelte Embryonen hinweisen. Der Wildtyp (WT) und die *recq4A* Mutante wiesen keine oder nur sehr wenige defekte Embryonen in ihren Schoten auf. Die heterozygote *wss1A* Mutante zeigte hingegen eine signifikant erhöhte Anzahl von defekten Embryonen. Bei der heterozygoten Doppelmutante waren ein Viertel aller Embryonen in den Schoten defekt. Statistische Unterschiede wurden mit einem zweiseitigen exakten Test von Fisher berechnet: $a \neq b$ wenn $p < 0,05$.

Die Schoten des Wildtyps und der *recq4A-4* Mutante enthielten fast ausnahmslos grüne Samen, mit vital erscheinenden Embryonen. Die Schoten der heterozygoten *wss1A-3* Mutante enthielten dagegen bereits etwa 7 % an bräunlichen, leeren Samenhüllen. Die *recq4A-4 -/- wss1A-3 +/-* Mutante wies mit einem Anteil von 25 % nochmal signifikant mehr defekte Samen auf. Der Anteil an defekten Samen in der *recq4A-4 -/- wss1A-3 +/-* Mutante entspricht der erwarteten Menge an homozygoten Doppelmutanten laut mendelscher Segregation und ist ein klarer Hinweis, dass die homozygote *recq4A-4 wss1A-3*

Doppelmutante embryolethal ist. Die Rohdaten der Embryonenanalyse können Tabelle 8.24 aus dem Anhang entnommen werden.

Aus diesem Grund sollte die Interaktion von WSS1A mit einem weiteren Faktor des RTR-Komplexes untersucht werden. Die *wss1A-3* Mutante wurde hierfür mit der *rmi1-2* Mutante gekreuzt. Doch auch für diesen Faktor konnte weder in der F2-, noch in der F3-Generation nach der Genotypisierung von je mindestens 40 Pflanzen eine Doppelmutante identifiziert werden. Zur weiteren Bekräftigung dieser Beobachtung wurde auch die *rmi1-2* *-/-* *wss1A-3* *+/-* Mutante einer Embryonenanalyse unterzogen (Anhang Abbildung 2). Wie bereits bei der ersten Untersuchung zeigte die heterozygote *wss1A-3* Mutante auch bei dieser Untersuchung mit einem Anteil von 9 % bereits signifikant mehr defekte Embryonen im Vergleich zum Wildtyp und zur *rmi1-2* Einzelmutante auf, die nur vitale Embryonen aufwies. Auch die *rmi1-2* *-/-* *wss1A-3* *+/-* Doppelmutante wies mit einem Anteil von 26 % an defekten Samen ein vergleichbares Ergebnis im Vergleich zur vorherigen Untersuchung auf. Dies bekräftigt die Beobachtung, dass der simultane Verlust von WSS1A und Komponenten des RTR-Komplexes in einer synthetischen Embryolethalität resultiert.

4. DISKUSSION

Während die Mechanismen der allgemeinen DNA-Reparatur bereits seit vielen Jahren untersucht und charakterisiert wurden, ist die Relevanz der DNA-Protein *crosslink* (DPC) Reparatur erst in den letzten Jahren in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt. DPCs stellen eine große Gefahr für die Genomintegrität dar, da diese Art von Schaden sehr häufig auftritt und sie durch ihre Sperrigkeit Chromatin assoziierte Prozesse behindern (Stinglele *et al.*, 2017). Genauere Erkenntnisse über beteiligte Faktoren und deren Wirkungsmechanismen wurden hauptsächlich durch die Forschung in Hefe oder in Metazoen gewonnen. Erst kürzlich wurden auch die relevantesten Faktoren für die Reparatur von nicht-enzymatischen DPC und kovalenten Topoisomerase 1 *cleavage complexes* (TOP1cc) in Pflanzen beschrieben (Enderle *et al.*, 2019). Sowohl die DNA-abhängige Protease WSS1A, wie auch die Endonuklease MUS81 tragen wesentlich zur Reparatur und Schadenstoleranz der zuvor genannten DNA-Schäden bei. Bislang fehlten jedoch noch Informationen darüber, wie kovalente Topoisomerase 2 *cleavage complexes* (TOP2cc) in Pflanzen repariert werden können. Topoisomerasen der Klasse 2 sind essenzielle Enzyme in allen Lebewesen, da sie die DNA während der Replikation, der Transkription oder auch der Rekombination durch die Einführung eines transienten Doppelstrangbruchs (DSB) relaxieren und dekatenerieren können (Wang, 1996). Topoisomerasen sind hochkonservierte Enzyme und die biologische Relevanz der Topoisomerase 2 (TOP2) wird dadurch unterstrichen, dass *top2* Mutanten der verschiedensten Organismen embryonal oder entwicklungsdefizient sind (Wasserman & Wang, 1994; Akimitsu *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2008; Mengoli *et al.*, 2014). Topoisomerasen sind einerseits essentiell, stellen aber andererseits auch eine Bedrohung für die Genomintegrität dar, da das temporäre Reaktionsintermediat in welchem die Topoisomerase mit der DNA über eine Phosphodiesterbindung verknüpft ist, spontan stabilisiert werden kann und so die Re-Ligation des DNA-Rückgrats verhindert wird. Durch ihre Fähigkeit DSB in der DNA zu induzieren, stellt die fehlerhafte Reaktion von TOP2 eine große Bedrohung dar, da dann ein komplexer DNA-Schaden entsteht, in welchem die Topoisomerase mit der DNA an dem induzierten DSB kovalent verbunden bleibt. Um diesen Schaden zu beheben muss zunächst der Proteinteil entfernt werden und anschließend der weiterhin bestehende DSB geschlossen werden. Wenn kovalente TOP2cc nicht rechtzeitig vor der Replikation repariert werden, kann es zu Mutationen, Chromosomentranslokationen und Chromosomenbrüchen kommen die schließlich zum Zelltod führen können (Felix *et al.*, 2006; Deweese & Osheroff, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch Sensitivitätsanalysen die Hauptreparaturwege der pflanzlichen TOP2cc Reparatur beschrieben werden. Durch Cas9 vermittelte Mutagenese konnten weiterhin Mutanten mit einem Defekt in dem pflanzlichen Homologs des TOP2cc Reparaturfaktors *Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 2* (*TDP2*) etabliert und untersucht werden. Des Weiteren konnte die Rolle der kürzlich charakterisierten Protease WSS1A bei der Erhaltung der pflanzlichen Genomstabilität näher definiert werden.

4.1 CHARAKTERISIERUNG VON *TDP2* MUTANTEN

Die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 2 (TDP2) wurde in Säugern bereits als ein wichtiger Faktor der TOP2cc Reparatur identifiziert. Der Funktionsmechanismus beruht auf der Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zwischen TOP2 und der DNA (Cortes Ledesma *et al.*, 2009). Durch phylogenetische Analysen konnte auch in Arabidopsis ein Homolog von TDP2 identifiziert werden, deren genaue Funktion in der pflanzlichen DNA Reparatur aber noch größtenteils unbekannt ist (Confalonieri *et al.*, 2014). Durch die CRISPR/Cas vermittelter Mutagenese wurden im Rahmen dieser Arbeit pflanzliche *tdp2* Mutanten etabliert und charakterisiert. Durch Sensitivitäts- und Epistasis Analysen konnte AtTDP2 anschließend in das pflanzliche DPC-Reparaturnetzwerk eingeordnet werden. Dabei konnte AtTDP2 eine spezifische Rolle in der TOP2cc Reparatur zugewiesen werden.

4.1.1 CRISPR/Cas vermittelte Mutagenese von *TDP2*

Zur funktionellen Charakterisierung von TDP2 wurden im Rahmen dieser Arbeit, durch die Verwendung des CRISPR/Cas Systems, Mutationen in *TDP2* eingefügt. Das CRISPR/Cas System ist ein etabliertes System, welches in zahlreichen Organismen zu Mutagenesezwecken genutzt wird (Bhaya *et al.*, 2011; Doudna & Charpentier, 2014; Puchta & Fauser, 2014). Es handelt sich hierbei um ein angepasstes System, welches ursprünglich der adaptiven Immunabwehr von Bakterien entstammt. Das daraus abgeleitete synthetische System zur zielgerichteten Mutagenese verfügt über eine Cas9 Nuklease die an eine programmierbare sgRNA gekoppelt ist, welche die Cas9 Nuklease zielgenau zu der ausgewählten DNA-Stelle, dem *protospacer*, führt. Das Cas9-Protein induziert dann 3 bp *downstream* des *protospacer adjacent motifs* (PAM), der Erkennungssequenz vor dem *protospacer*, einen DSB, der dann durch den in höheren Eukaryoten vorherrschenden Mechanismus des fehlerbehafteten NHEJ repariert wird. Bei diesem Prozess kommt es in der Zielsequenz dementsprechend häufiger zu Mutationen, in Form von kleineren Insertionen oder Deletionen (Puchta & Fauser, 2014). Aufgrund der verbesserten Mutageneseeffizienz wurde im Rahmen dieser Arbeit das Cas9-Ortholog von *S. aureus* verwendet (Steinert *et al.*, 2015). Durch die Verwendung von zwei sgRNAs sollte durch das simultane Einführen von zwei DSBs eine große Deletion in *TDP2* generiert werden, da durch diese Methode in vorherigen Arbeiten bereits ganze DNA-Abschnitte innerhalb eines Chromosoms deletiert werden konnten (Schmidt *et al.*, 2019). Hierfür wurden in zwei Ansätzen je eine Zielsequenz vor, und eine nach der funktionellen Endonuklease/Exonuklease/Phosphatase Domäne von *TDP2* gewählt. Zur schnelleren Etablierung von Doppelmutanten, welche in Epistasis-Analysen untersucht werden sollten, wurden die jeweiligen Konstrukte nicht nur in den Wildtyp, sondern auch in *tdp1* und *wssIA* Mutantenlinien eingebracht. Erste Analysen in der T2-Generation zeigten jedoch, dass mit keinem der beiden Ansätze eine große Deletion in *TDP2* generiert werden konnte. Durch nachfolgende HRM-Analysen konnte detektiert werden, dass nur an einer der vier ausgewählten Zielsequenzen effizient geschnitten wurde. Die entsprechende Zielsequenz (PS1) befand sich im ersten Exon kurz nach den zwei Zinkfinger-

RanBP2 Domänen aber noch vor der prognostizierten Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization signal*, NLS) und vor der funktionellen Endonuklease/Exonuklease/Phosphatase Domäne (Abbildung 3.1). Die Zinkfinger-RanBP2-Domänen gehören einer Klasse von RNA-Bindungsdomänen an, weshalb vermutet wird, dass pflanzliche TDP2 Homologe an der mRNA Regulation beteiligt sind (Nguyen *et al.*, 2011; Confalonieri *et al.*, 2014). Anstatt der Zinkfinger RanBP2-Domänen verfügt HsTDP2 über eine UBA (*ubiquitin associated*) -Domäne, für welche unabhängig von der funktionellen Endonuklease/Exonuklease/Phosphatase Domäne eine Funktion in der rRNA Biogenese nachgewiesen werden konnte (Vilotti *et al.*, 2012). Es wurde daher gemutmaßt, dass TDP2 durch die Zinkfinger-RanBP2 Domänen eine ähnliche Funktion erfüllen könnte (Confalonieri *et al.*, 2014). Sowohl für die Funktion als Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase, als auch für die Funktion in der mRNA Prozessierung müsste sich TDP2 jedoch im pflanzlichen Zellkern befinden. Für den Transport in Zellkern bedarf es einer intakten NLS, da diese den Eintritt vermittelt (Mattaj & Englmeier, 1998). Da PS1 jedoch noch vor der NLS lokalisierte und sich zwischen PS1 und der NLS kein alternatives Startcodon mehr befand, kann davon ausgegangen werden, dass im Falle einer *frameshift* Mutation an der Zielsequenz nur ein kleines Restprotein von TDP2 synthetisiert werden kann, welches aber keine weitere Funktion erfüllt, da es nicht an seinen Zielort gelangen kann und auch nicht über die funktionelle Domäne verfügt. Aus diesem Grund wurden *frameshift* Mutationen an PS1 für geeignet befunden um zu einem vollständigen Funktionsverlust von TDP2 zu führen. Auf diese Weise wurden zwei *tdp2* Mutantenlinien im Wildtyp Hintergrund generiert, eine mit einer 5 bp Deletion (*tdp2-1*) und eine mit einer 1 bp Insertion (*tdp2-2*). Im *tdp1* Hintergrund wurde die gleiche Mutation wie bei *tdp2-2* generiert (*tdp2-3*) und im *wss1A* Hintergrund wurde eine Mutante mit einer 1 bp Deletion (*tdp2-4*) etabliert. Um sicherzustellen, dass die generierten Mutationen auch nach dem Spleißen erhalten bleiben, wurde die Gesamt RNA aus den jeweiligen Mutanten isoliert, die mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend sequenziert. Alle Mutationen konnten auch auf dem mRNA Level nachgewiesen werden (Abbildung 3.2). Für jede der Mutationen konnte gezeigt werden, dass sie zu einer Verschiebung des Leserastes führt, wodurch ein verfrühtes Stopcodon entsteht. Dies bewirkt einen verfrühten Translationsstopp, weshalb nur ein kleiner Teil des Proteins synthetisiert werden kann. Durch die anschließende Untersuchung der verschiedenen Mutantenlinien konnte die Funktion von TDP2 in der pflanzlichen DNA-Reparatur erstmals genauer charakterisiert werden.

4.1.2 Die Rolle von TDP2 in der somatischen DNA Reparatur

Zur Charakterisierung der beiden *tdp2* Einzelmutanten, wurden diese zunächst auf phänotypische Unterschiede zum Wildtyp untersucht. Die beiden *tdp2* Mutanten wiesen sowohl hinsichtlich ihres Wuchsphänotyps, als auch ihrer Wurzellänge den gleichen Phänotyp auf und unterschieden sich dabei nicht vom Wildtyp (Abbildung 3.3). Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Mäusen mit einer homozygoten Mutation in *TDP2* gemacht werden. Auch diese wiesen keine offensichtlichen

phänotypischen Auffälligkeiten auf (Gómez-Herreros *et al.*, 2013). Im Menschen resultiert der vollständige Funktionsverlust von TDP2 dagegen in einer seltenen neurodegenerativen Erbkrankheit, der spinocerebellären Ataxie mit axonaler Neuropathie 23 (SCAN23), welche assoziiert ist mit Epilepsie, geistiger Behinderung, Sprachverzögerung und verschiedenen körperlichen Anomalien (Zagnoli-Vieira *et al.*, 2018; Ciaccio *et al.*, 2019; Errichiello *et al.*, 2020). Hierbei wird vermutet, dass die Akkumulation von unprozessierten kovalenten TOP2cc eine endogene Bedrohung für die Gentranskription und für die normale neuronale Entwicklung darstellt (Gómez-Herreros *et al.*, 2014). Da für das menschliche TDP2 Homolog eine 5'-Phosphodiesterase-Aktivität nachgewiesen wurde, mit welcher es spezifisch die Bindung zwischen TOP2 und der DNA hydrolysieren kann, wurde untersucht ob das pflanzliche Homolog ebenfalls eine Funktion in der Reparatur von TOP2cc hat (Cortes Ledesma *et al.*, 2009). Zu diesem Zweck wurde die Sensitivität der *tdp2*-Mutanten gegenüber dem Genotoxin Etoposid (Eto) getestet. Eto kann sowohl als Enzymgift, als auch als Enzyminhibitor wirken (Gibson *et al.*, 2016). Als Gift stabilisiert es durch die Abkopplung wichtiger katalytischer Reste das Reaktionsintermediat von TOP2 und der DNA, wodurch die Re-Ligation verhindert wird und kovalente TOP2cc entstehen (Bender *et al.*, 2008). Als Inhibitor interagiert Eto mit dem katalytischen Zentrum von TOP2 und vermindert so die Anzahl der aktiven TOP2cc (Gibson *et al.*, 2016). Um die Sensitivität der *tdp2* Mutanten gegen Eto zu testen, wurde die Anzahl toter Zellen im Wurzelmeristem vor und nach der Behandlung mit Eto ermittelt. Das Wurzelmeristem ist ein sich schnell teilendes Gewebe, weshalb es besonders empfindlich auf replikative Schäden reagiert, da diese eine Verzögerung des Zellzyklus bewirken können. Ein schnelles Wachstum ist in der Natur aber von großer Bedeutung, weshalb es von Vorteil sein kann, wenn Zellen den programmierten Zelltod eingehen anstatt den Schaden zeitaufwendig zu reparieren (Fulcher & Sablowski, 2009). Eine erhöhte Anzahl toter Zellen im Wurzelmeristem korreliert daher mit einer verstärkten Akkumulation replikativer Schäden. Die Eto-Sensitivitätsanalyse zeigte, dass beide *tdp2* Mutanten eine erhöhte Anzahl toter Zellen nach der Behandlung mit Eto aufwiesen, und somit sensitiv auf Eto reagierten, wohingegen der Wildtyp keine Sensitivität aufwies (Abbildung 3.4). Da beide *tdp2* Mutanten dieselbe Sensitivität gegen Eto aufwiesen, kann diese als spezifisch für die Mutation in *TDP2* gedeutet werden. Das bedeutet, dass TDP2 auch in Pflanzen in die TOP2cc Reparatur involviert ist. Da die erfolgreiche TOP2cc Reparatur durch TDP2 eine aktive 5'-Phosphodiesterase-Aktivität benötigt, scheint diese in Pflanzen funktionell konserviert zu sein.

Die Phosphodiesterase-Aktivität von humanem TDP2 wurde ursprünglich in einem heterologen Komplementationsscreening von TOP1cc-Reparaturdefizienten Hefezellen identifiziert. Die heterologe Expression von HsTDP2 bewirkte eine Suppression der Sensitivität gegen CPT in Hefezellen, die einen simultanen Defekt in den TOP1cc Reparaturfaktoren Tdp1 und Rad1 aufwiesen (Cortes Ledesma *et al.*, 2009). Da CPT spezifisch das Reaktionsintermediat von TOP1 stabilisiert und dadurch die Re-Ligation des DNA-Rückgrats verhindert, wurde daraus geschlossen, dass HsTDP2 in die TOP1cc Reparatur involviert ist. Zur weiteren Untersuchung wurde die Phosphodiesterase-Aktivität durch *in vitro* Versuche getestet (Hsiang *et al.*, 1989; Cortes Ledesma *et al.*, 2009). Dabei konnte nachgewiesen

werden, dass HsTDP2 sowohl über eine starke 5'-Phosphodiesterase-Aktivität, als auch über eine schwächere 3'-Phosphodiesterase-Aktivität verfügt (Cortes Ledesma *et al.*, 2009). Bei nachfolgenden *in vivo* Versuchen in Zellkulturen und in Mäusen, konnte gezeigt werden, dass TDP2 nur als *back-up*, in Abwesenheit von TDP1, in die TOP1cc Reparatur involviert ist. *TDP2*^{-/-} Einzelmutanten wiesen keine Sensitivität gegen CPT auf, aber der simultane Verlust von TDP1 und TDP2 führte zu einem synergistischen Effekt, da die Doppelmutante eine stärkere Sensitivität gegen CPT als die *TDP1*^{-/-} Einzelmutante aufwies (Zeng *et al.*, 2012). Um zu überprüfen ob TDP2 eine ähnliche Funktion in der pflanzlichen TOP1cc Reparatur einnimmt, wurden Sensitivitätsanalysen mit der *tdp2* Einzelmutante und Doppelmutanten, die einen simultanen Defekt in *TDP2*, sowie auch in entweder *TDP1*, *MUS81* oder *WSS1A* aufwiesen, durchgeführt. Für diese Faktoren konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie in die pflanzliche TOP1cc Reparatur involviert sind. TOP1cc werden in Pflanzen bevorzugt durch die Endonuklease MUS81 prozessiert, aber auch die Proteolyse des Proteinanteils durch WSS1A stellt einen wichtigen Reparaturweg dar. Die Hydrolyse der 3'-Phosphodiesterbindung zwischen TOP1 und der DNA durch die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) stellt, im Gegensatz zur TOP1cc Reparatur in Vertebraten, nur einen *back-up* Mechanismus bei der Reparatur von pflanzlichen TOP1cc dar (Enderle *et al.*, 2019). Da TDP2 in Säugern nur in Abwesenheit des TOP1cc Reparaturfaktor TDP1 in die TOP1cc Reparatur involviert ist, wurden die jeweiligen Einzelmutanten und die CRISPR/Cas generierte *tdp2 tdp1* Doppelmutante einer CPT-Sensitivitätsanalyse unterzogen. Weder die *tdp2* Einzelmutante, noch die *tdp2 tdp1* Doppelmutante zeigten jedoch eine Sensitivität gegen CPT, was bedeutet, dass TDP2 keine direkte Funktion in der pflanzlichen TOP1cc Reparatur hat und dass TDP1 und TDP2 sich auch nicht gegenseitig in der TOP1cc Reparatur komplementieren können (Abbildung 3.7). Da TDP1 nur eine untergeordnete Funktion in der pflanzlichen TOP1cc Reparatur einnimmt, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob TDP2 in die TOP1cc Reparatur involviert ist, wenn einer der TOP1cc Hauptreparaturfaktoren, MUS81 oder WSS1A, fehlt. Über eine potentielle genetische Interaktion von TDP2 und den anderen beiden Faktoren war bislang auch nichts von anderen Organismen bekannt. Während die *tdp2 wss1A* Doppelmutante in dem gleichen Cas9 vermittelten Mutagenese Ansatz wie die *tdp2* Einzelmutante generiert wurde, wurde die *tdp2 mus81* Doppelmutante nachfolgend durch Kreuzung generiert. Bei der anschließenden CPT-Sensitivitätsanalyse der *tdp2 mus81* und der *tdp2 wss1A* Doppelmutantenlinien wurde jedoch ersichtlich, dass die Sensitivität der jeweiligen Doppelmutanten stets auf dem Niveau der entsprechenden TOP1cc-Reparaturdefizienten Einzelmutante lag (Abbildung 3.10 und 3.13). Beide Doppelmutantenlinien zeigten dementsprechend keinen synergistischen Effekt, was bedeutet, dass TDP2 auch in Abwesenheit von MUS81 oder WSS1A nicht in die TOP1cc Reparatur involviert ist. Das bedeutet, dass AtTDP2, im Gegensatz zu HsTDP2, keine Rolle in der TOP1cc Reparatur spielt und auch nicht als *back-up* Mechanismus fungieren kann, wenn einer der Hauptreparaturfaktoren abwesend ist. Somit scheint das pflanzliche TDP2 Homolog spezifisch in der TOP2cc Reparatur zu agieren.

4.2 ALLGEMEINE MECHANISMEN DER TOP2CC REPARATUR

Im Gegensatz zur Reparatur von nicht-enzymatischen DPCs und TOP1ccs waren die grundlegenden Reparaturmechanismen der TOP2cc Reparatur in Pflanzen bisher noch unbekannt. Dabei stellen TOP2cc einen besonders komplexen Schaden dar, der eine Reparatur in mehreren Schritten bedarf, da zunächst der Proteinanteil entfernt werden muss, bevor der verbleibende DSB geschlossen werden kann. Da TOP2cc mit einem DSB assoziiert sind, besteht die Gefahr von Chromosomenfragmentationen, welche die Umstrukturierung des Genoms bewirken können (Felix *et al.*, 2006; Deweese & Osheroff, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob die bereits bekannten DPC-Reparaturfaktoren TDP1, MUS81 und WSS1A an der TOP2cc Reparatur beteiligt sind. Durch die Charakterisierung von *tdp2* Mutanten, konnte bereits ein Faktor identifiziert werden, der zur Reparatur von TOP2cc beiträgt. Um die genaue Interaktion von TDP2 mit den restlichen DPC-Reparaturfaktoren in der TOP2cc Reparatur zu entschlüsseln, wurden außerdem Epistasis Analysen mit entsprechenden Doppelmutantenlinien durchgeführt. Durch die Behandlung mit dem TOP2cc induzierenden Genotoxin Eto, konnte definiert werden, welche Faktoren neben TDP2 zur Entfernung von TOP2 beitragen. Dabei konnte neben TDP2 vor allem der Protease WSS1A eine Rolle in der TOP2cc Reparatur zugewiesen werden. Durch nachfolgende Eto-Sensitivitätsanalysen mit Mutanten, die sowohl einen Defekt in einem TOP2cc Hauptreparaturfaktor, als auch einen weiteren Defekt in entweder dem aNHEJ Faktor POLQ, oder dem cNHEJ Faktor LIG4 aufwiesen, konnte außerdem entschlüsselt werden, wie der verbleibende DSB nach der Entfernung von TOP2 in Pflanzen repariert wird.

4.2.1 Die Entfernung von TOP2

Um zu untersuchen, welche der bereits bekannten DPC-Reparaturfaktoren neben TDP2 an der Reparatur von TOP2cc beteiligt sind, wurden die einzelnen Mutantenlinien mit Defekten in MUS81, TDP1 und WSS1A auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dem TOP2cc induzierenden Genotoxin Eto getestet. Hierfür wurde die Anzahl toter Zellen im Wurzelmeristem in unbehandeltem Zustand, sowie nach der Behandlung mit Eto ermittelt. Während die *tdp1*- und die *tdp2*-Einzelmutantenlinien im unbehandelten Zustand keine abgestorbenen Zellen pro Wurzel aufwiesen, zeigten die *mus81*- und *wss1A*-Einzelmutantenlinien bereits im unbehandelten Zustand eine deutlich erhöhte Anzahl abgestorbener Zellen pro Wurzel (Abbildung 3.5). Dies steht im Einklang mit früheren Analysen der entsprechenden Einzelmutantenlinien und deutet darauf hin, dass sowohl WSS1A als auch MUS81 sehr wichtige Reparaturfaktoren sind, die für die Beseitigung von häufig auftretenden endogenen DNA-Schäden erforderlich sind (Enderle *et al.*, 2019). Im Fall von WSS1A wurde postuliert, dass dies auf endogen auftretende DPCs beschränkt ist, während MUS81 die Toleranz gegenüber verschiedenen Arten von DNA-Schäden, wie DPCs, Inter- und Intrastrang-*crosslinks* oder Alkylierungs-assoziierten DNA-Schäden, fördern kann (Hartung *et al.*, 2006; Mannuss *et al.*, 2010; Enderle *et al.*, 2019). Bei der Behandlung mit Eto wiesen neben der *tdp2* Mutante nur die *wss1A* und *mus81* Mutanten eine verstärkte

Sensitivität auf, während die *tdp1* Mutante keine Sensitivität zeigte. Dies deutet darauf hin, dass WSS1A und MUS81 in die TOP2cc Reparatur involviert sind, während TDP1 nicht direkt beteiligt zu sein scheint. Die Vermutung, dass WSS1A an der TOP2cc-Reparatur beteiligt ist, steht im Einklang mit Studien in Hefezellen und menschlichen Zellkulturen, in denen Zellen, die einen Defekt in den funktionellen Homologen ScWss1 und HsSPRTN hatten, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Eto aufwiesen (Lopez-Mosqueda *et al.*, 2016; Serbyn *et al.*, 2020). Da es sich bei WSS1A um eine Protease mit einer breiten Substratspezifität handelt, sollte die Proteinstruktur von TOP2 auch kein Hindernis für die WSS1A vermittelte Proteolyse darstellen. Es konnte vielmehr gezeigt werden, dass spezifische aktivierende DNA-Strukturen, welche Unterbrechungen in der doppelsträngigen DNA aufweisen, für die Selektivität des funktionellen Homologs SPRTN benötigt werden. Die Selektivität wird dadurch gegeben, dass SPRTN über zwei verschiedene DNA-Bindestellen verfügt, von denen eine doppelsträngige und die andere einzelsträngige DNA erkennt. Da bei TOP2cc diese Unterbrechungen in der doppelsträngigen DNA gegeben sind, wird vermutet, dass die DPC-Proteasen der SPRTN/Wss1 Familie in der Lage sein sollten, diesen spezifischen DPC zu prozessieren (Reinking *et al.*, 2020b).

In Bezug auf die TOP2cc Reparatur durch TDP2, gab es jedoch noch keine Informationen darüber, ob TDP2 und WSS1A und ihre jeweiligen Homologe in demselben oder in unabhängigen Wegen der TOP2cc-Reparatur agieren. Für HsTDP2 konnte gezeigt werden, dass es den TOP2cc nur nach vorheriger Proteolyse von TOP2 durch das Proteasom, oder nach einer durch die SUMO-E3-Ligase ZNT451/ZATT vermittelten Konformationsänderung von TOP2cc auflösen kann, da die 5'-Phosphodiesterbindung sonst nicht zugänglich ist (Gao *et al.*, 2014; Schellenberg *et al.*, 2017). Es wurde außerdem postuliert, dass die TDP2-vermittelte Hydrolyse der *crosslink*-Bindung der einzige Weg ist, TOP2cc in Abwesenheit des Proteasoms aufzulösen (Zagnoli-Vieira & Caldecott, 2017). Daher wäre es möglich, dass WSS1A, ähnlich wie das Proteasom, eine Funktion beim Abbau von TOP2 vor der TDP2-vermittelten Hydrolyse haben könnte. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden eine *tdp2 wss1A* Doppelmutante generiert und charakterisiert. Der Wuchstyp der Doppelmutante fiel im Vergleich zur *wss1A* Einzelmutante durch eine reduzierte Wuchshöhe auf. Auch die Wurzeln der Doppelmutante waren im Vergleich zur *wss1A* Mutante signifikant reduziert in ihrer Länge (Abbildung 3.12). Da das Wurzelmeristem durch seine starke Teilungsrate sehr empfindlich auf replikative Schäden reagiert, kann aus dieser Beobachtung bereits geschlossen werden, dass sich WSS1A und TDP2 in der replikativen DNA-Reparatur, zumindest teilweise, gegenseitig kompensieren können. Mit einer nachfolgenden Eto-Sensitivitätsanalyse wurde überprüft, ob die beiden Faktoren einen gemeinsamen, oder parallele Wege der TOP2cc Reparatur definieren. Nach der Behandlung mit Eto, wiesen die Wurzeln der *tdp2 wss1A* Doppelmutante einen synergistischen Effekt, mit signifikant mehr toten Zellen als beide Einzelmutantenlinien auf (Abbildung 3.13). Diese verstärkte Sensitivität gegen Eto deutet daraufhin, dass die beiden Faktoren unabhängig voneinander in der TOP2cc Reparatur agieren, und somit parallele Wege der TOP2cc Reparatur definieren. Entsprechend der enzymatischen Aktivität vermittelt WSS1A vermutlich die proteolytische Degradation von TOP2 und hinterlässt dabei kleine Peptidreste an den 5'-

Enden des DSB, während TDP2 in einem weiteren Reparaturweg die Phosphodiesterbindung zwischen TOP2 und der DNA hydrolysiert und dabei einen glatten DSB mit Phosphatresten an den 5'-Enden generiert (Gómez-Herreros *et al.*, 2013; Stingele *et al.*, 2014).

Im Gegensatz zu WSS1A, ist von MUS81 auch aus anderen Organismen noch nichts über die Funktion in der TOP2cc Reparatur bekannt. Die verstärkte Sensitivität der *mus81* Mutante in der Eto-Sensitivitätsanalyse, war jedoch ein erster Hinweis, dass MUS81 in die TOP2cc Reparatur involviert sein könnte. Da in der ersten Sensitivitätsanalyse die Anzahl toter Zellen nach der Behandlung mit Eto innerhalb der verschiedenen Versuchsansätze stark variierte, konnte noch kein eindeutiger Rückschluss gezogen werden. Um zu untersuchen, ob MUS81 in Abwesenheit von TDP2 eine stärkere Funktion in der TOP2cc Reparatur erfüllt, wurde eine *tdp2 mus81* Doppelmutante etabliert und analysiert. Hinsichtlich des Wuchstypus und der Wurzellänge konnten keine Unterschiede zwischen der Doppelmutante und den Kontrollen, im speziellen der *mus81* Einzelmutante, festgestellt werden (Abbildung 3.9). Dies weist bereits darauf hin, dass MUS81 und TDP2 den Verlust des jeweilig anderen Faktors, in der replikativen DNA Reparatur, nicht kompensieren können. In der nachfolgenden Eto-Sensitivitätsanalyse zeigte die Doppelmutante zwar eine höhere Anzahl an toten Zellen nach Behandlung mit Eto, als beide Einzelmutanten, diese ging jedoch nicht über einen additiven Effekt hinaus (Abbildung 3.11). Dieser könnte ein Resultat der Mutation in *MUS81*, welche bereits eine erhöhte Anzahl an toten Zellen im Normalzustand bewirkt, und der zusätzlichen Abwesenheit von TDP2 sein, welche in einer verstärkten Sensitivität gegen Eto resultiert und somit eine erhöhten Anzahl an toten Zellen nach Behandlung mit Eto bewirkt. Die *mus81* Einzelmutante zeigte bei dieser Analyse keine signifikante Sensitivität gegen Eto. Da die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze bei dieser Sensitivitätsanalyse konstanter waren, weist dies auf eine eher untergeordnete Funktion von MUS81 bei der TOP2cc Reparatur hin. Der allgemeine Wirkmechanismus von MUS81 bei der DPC-Reparatur besteht entweder in der Spaltung blockierter Replikationsgabeln, wodurch nachgeschaltete DSB-Reparaturwege aktiviert werden, oder in der Auflösung von Rekombinationsintermediaten, die nach der Replikationsgabelregression und dem anschließenden Neustart der Replikationsgabel entstehen können (Abbildung 1.5) (Regairaz *et al.*, 2011; Pardo *et al.*, 2020). Bei der Spaltung von Replikationsgabeln durch MUS81, wurde lange vermutet, dass der dabei entstehende einseitige DSB durch Mechanismen der Homologen Rekombination (HR) wieder repariert wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass MUS81 und der aNHEJ Faktor POLQ in Pflanzen in einem gemeinsamen Weg der TOP1cc Reparatur agieren, da beide Einzelmutanten und die Doppelmutante eine starke Sensitivität gegen CPT aufwiesen, die auf einem vergleichbaren Niveau lag (Abbildung 3.21). Das bedeutet, dass der einseitige DSB der durch MUS81 an der blockierten Replikationsgabel induziert wird, durch das aNHEJ wieder geschlossen wird. Dieses Ergebnis stimmt mit Studien in humanen Zellkulturen überein, in welchen gezeigt werden konnte, dass die Abwesenheit von POLQ zu einer verstärkten Sensitivität gegen Genotoxine, die Replikationsstress verursachen, führt (Wang *et al.*, 2019). Auch in Arabidopsis konnte bereits gezeigt werden, dass POLQ für die Reparatur von replikationsassoziierten DSB zuständig

ist (Nisa *et al.*, 2021). Entsprechend dem TOP1cc Reparaturmodell von Regairaz *et al.*, 2011, würde MUS81 die Replikationsgabel schneiden um die Torsionsspannung aufzulösen und dabei einen einseitigen DSB erzeugen (Regairaz *et al.*, 2011). Dieser wird durch die konvergierende Replikationsgabel zu einem zweiseitigen DSB (Wang *et al.*, 2019). Die 5'-Enden dieses zweiseitigen DSB sind durch die verstärkte Aktivität des MRN-Komplexes in der S- und G2- Phase vermutlich resektiert, wodurch in den 3'-Überhängen des DSBs Mikrohomologie in beiden Strängen freigelegt werden, welche die DSB Reparatur durch aNHEJ begünstigen (Escribano-Díaz *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2017). Die Mikrohomologien können sich gemäß dem aNHEJ Weg in Folge aneinanderlagern und die heterologen 3'-Überhänge, an welchen sich, falls er nicht durch alternative Faktoren wie WSS1A und TDP1 entfernt wurde, noch der TOP1cc befinden sollte, könnten dann durch Nukleasen entfernt werden (Chang *et al.*, 2017). Aufgrund der Fähigkeit 3'-*flaps* zu schneiden, wäre es auch möglich, dass der heterologe 3'-Überhang mit dem TOP1cc, durch MUS81 geschnitten wird (Geuting *et al.*, 2009). Da bei einem TOP2cc beide DNA Stränge betroffen sind, wäre die Aktivität von MUS81 bei Induktion eines DSB in der Replikationsgabel vermutlich wenig sinnvoll, da der andere Strang dann immer noch beschädigt wäre und dann statt einem, gleich zwei zu reparierende DSB vorliegen würden. Anders als bei den TOP1cc wäre MUS81 auch nicht in der Lage den TOP2cc nochmals nachfolgend zu prozessieren, da es nicht über die Fähigkeit verfügt 5'-*flaps* zu schneiden. Bei dem alternativen TOP1cc Reparaturmodell nach Pardo, löst MUS81 Rekombinationsintermediate auf, die bei der Wiederherstellung der Replikationsgabel nach der HR entstehen können (Pardo *et al.*, 2020). Dieses Modell scheint in Pflanzen zwar unwahrscheinlich als Hauptreparaturmodell von MUS81, da die HR nur eine untergeordnete Funktion bei der DSB Reparatur spielt (Puchta, 2005). Doch falls MUS81 eine Funktion in der TOP2cc Reparatur einnimmt, wäre es wahrscheinlicher, wenn diese eher in der nachfolgenden DSB Reparatur liegt.

Obwohl die *tdp1* Einzelmutante keine Sensitivität gegen Eto zeigte, sollte sie auch in diesem Fall auf eine potentielle *back-up* Funktion überprüft werden, da in Vertebraten und in Hefe bereits demonstriert wurde, dass TDP1 partiell in die Reparatur von TOP2cc involviert ist. TOP2 überexprimierende Hefezellen mit einer Mutation in *Tdp1* wiesen bereits eine erhöhte Sensitivität gegen Eto auf, die noch mehr verstärkt wurde, wenn Faktoren des NHEJ oder der postreplikativen DNA-Reparatur ebenfalls abwesend waren (Nitiss *et al.*, 2006). Auch Hühnerzelllinien mit einem Defekt in *TDP1* zeigten eine erhöhte Sensitivität gegen Eto (Murai *et al.*, 2012). Um zu überprüfen ob TDP1 in Abwesenheit von TDP2 eine Funktion in der pflanzlichen TOP2cc Reparatur einnimmt, wurde eine entsprechende Doppelmutantenlinie generiert und analysiert. Phänotypisch wies die Doppelmutante, wie auch die beiden Einzelmutanten, keine Auffälligkeiten auf (Abbildung 3.6). Bei der nachfolgenden Eto-Sensitivitätsanalyse entsprach die Sensitivität der Doppelmutante dem Niveau der *tdp2* Einzelmutante (Abbildung 3.8). Dies bedeutet, dass TDP1 auch in Abwesenheit von TDP2 nicht in die TOP2cc Reparatur involviert ist. Auch in menschlichen Zellkulturen mit einem simultanen Defekt in HsTDP1 und HsTDP2 konnte kein synergistischer Effekt bezüglich der Eto-Sensitivität beobachtet werden (Zeng

et al., 2012). Es konnte allerdings in *in vitro* Analysen nachgewiesen werden, dass rekombinant exprimiertes HsTDP1 über eine schwache 5'-Phosphodiesteraktivität verfügt (Murai *et al.*, 2012). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Überexpression von HsTDP1 in menschlichen Zellkulturen in einer verstärkten Resistenz gegen Eto resultiert (Barthelmes *et al.*, 2004). Daher wäre es möglich, dass AtTDP1 ebenfalls über eine schwache 5'-Phosphodiesteraktivität verfügt und in Abwesenheit weiterer TOP2cc Reparaturfaktoren als *back-up* fungieren kann. Insgesamt scheint TDP1 für eine funktionelle TOP2cc Reparatur jedoch entbehrlich zu sein.

4.2.2 Die DSB Reparatur nach der Entfernung von TOP2

Für die DPC Reparaturfaktoren WSS1A und TDP2 konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass sie an der Reparatur von TOP2cc beteiligt sind. Entsprechend der bereits aus anderen Organismen bekannten enzymatischen Aktivität, hydrolysiert TDP2 wahrscheinlich die 5'-Phosphodiesterbindung zwischen TOP2 und der DNA, während WSS1A TOP2 proteolytisch degradiert (Cortes Ledesma *et al.*, 2009; Stinglele *et al.*, 2014). In beiden Fällen bleibt der DSB, mit dem TOP2 zuvor assoziiert war bestehen. Um zu überprüfen wie die DSB-Intermediate jeweils nach der TDP2 und der WSS1A vermittelten Entfernung von TOP2 wieder geschlossen werden, wurden Doppelmutanten von *tdp2* und *wss1A* mit der aNHEJ Mutante *teb* und der cNHEJ Mutante *lig4* generiert und in Eto-Sensitivitätsanalysen untersucht. Die Analysen zeigten, dass sowohl die *teb*, als auch die *lig4* Einzelmutante bereits sensitiv auf Eto reagierten, was bedeutet, dass beide NHEJ Wege in die TOP2cc Reparatur involviert sind. Die *lig4* Mutante wies unbehandelt nahezu keine toten Zellen auf, wohingegen *lig4* Wurzeln, die mit Eto behandelt wurden durchschnittlich 10 tote Zellen zeigten (Abbildung 3.15 und 3.17). Die *teb* Mutante dagegen, wies bereits im unbehandelten Zustand eine erhöhte Anzahl von durchschnittlich 7 toten Zellen auf und nach der Behandlung mit Eto waren durchschnittlich 12 tote Zellen pro Wurzel sichtbar (Abbildung 3.16). Da die *teb* Mutante eine geringere Differenz an toten Zellen nach der Behandlung mit Eto als die *lig4* Mutante aufwies, scheint die DSB Reparatur durch cNHEJ eine etwas wichtigere Rolle, als die Reparatur durch aNHEJ in der TOP2cc Reparatur zu spielen. In Bezug auf die Interaktion von TDP2 und den NHEJ Wegen, konnte gezeigt werden, dass sowohl die *lig4 tdp2*, als auch die *teb tdp2* Doppelmutante signifikant mehr tote Zellen als die *tdp2* Einzelmutante aufwies, was zunächst darauf hindeutet, dass beide NHEJ Wege parallel zu TDP2 in der TOP2cc Reparatur agieren (Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16). Da die *lig4 tdp2* Doppelmutante jedoch signifikant weniger tote Zellen aufwies, als die *lig4* Einzelmutante, weist dies darauf hin, dass durch die TDP2 vermittelte *crosslink* Hydrolyse DSB-Intermediate erzeugt werden, die bevorzugt durch cNHEJ repariert werden. Durch *in vitro* Studien mit Zellextrakten aus embryonalen Maus Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass nach der TDP2 vermittelten Entfernung von TOP2 ein glatter DSB mit einem 4 bp Überhang, einer 5'-Phosphat- und einer 3'-OH-Gruppe, bestehen bleibt, der durch Ligation fehlerfrei geschlossen werden kann (Gómez-Herreros *et al.*, 2013). Da auch in Pflanzen bereits gezeigt werden

konnte, dass ein Großteil der durch Cas9 induzierten DSBs fehlerfrei durch cNHEJ repariert werden kann, kann angenommen werden, dass der glatte DSB nach der TDP2 vermittelten Entfernung von TOP2 prädestiniert für die fehlerfreie Ligation durch cNHEJ ist (Schmidt *et al.*, 2019). In der Abwesenheit von TDP2 scheinen in Pflanzen dagegen andere Faktoren an der Entfernung von TOP2 beteiligt zu sein, welche DSB-Intermediate generieren, die nicht für die Reparatur durch cNHEJ geeignet sind und dann bevorzugt durch aNHEJ geschlossen werden. Dies steht im Kontrast zu bisherigen Erkenntnissen aus Studien in Vertebraten, welche zeigten, dass cNHEJ, unabhängig von TDP2, der bevorzugte Weg zur Schließung des DSB in der TOP2cc Reparatur ist. Im Gegensatz zu Arabidopsis reagierten Hühnerzelllinien, die sowohl einen Defekt in *TDP2* als auch in dem cNHEJ Faktor *KU70* aufwiesen, genauso sensitiv auf die Behandlung mit Eto, wie *KU70*^{-/-} Einzelmutanten. Dies wurde dadurch erklärt, dass in Abwesenheit von TDP2 Nukleasen den TOP2cc prozessieren und der dabei resultierende DSB anschließend durch einen fehlerhaftes cNHEJ geschlossen wird, oder zu einem geringeren Grad auch durch HR (Gómez-Herreros *et al.*, 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass der aNHEJ Mechanismus in Pflanzen einen besonderen Stellenwert bei der Reparatur von TOP2cc einnimmt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Protease WSS1A unabhängig von TDP2 in die TOP2cc Reparatur involviert ist. Nach der Proteolyse von TOP2 durch WSS1A bleiben voraussichtlich jedoch kleine Peptidreste an den 5'-Enden des DSBs, welche eine direkte Ligation durch cNHEJ nicht ermöglichen würden. Diese müssten folglich zunächst entfernt werden, bevor der verbleibende DSB geschlossen werden kann. Durch *in vitro* Analysen mit Zellextrakten aus Vertebraten konnte gezeigt werden, dass der MRN-Komplex unbedingt erforderlich ist, um sperrige 5'-Addukte von der DNA zu entfernen (Deshpande *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2016). Pflanzen verfügen ebenfalls über einen MRN-Komplex, für welchen bereits nachgewiesen wurde, dass er zur Entfernung des TOP2-ähnlichen SPO11-Dimers während der Meiose beiträgt (Puizina *et al.*, 2004). Es wäre daher schlüssig, wenn der MRN-Komplex in Pflanzen die Entfernung der 5'-Peptidreste, nach der WSS1A vermittelten Proteolyse von TOP2, bewirken würde. Da die Aktivität des MRN-Komplexes mit der Resektion der 5'-Enden assoziiert ist, entsteht ein DSB mit 3'-Überhängen, der das perfekte Intermediat für die Reparatur durch aNHEJ darstellt (Garcia *et al.*, 2011). Diese Hypothese stimmt mit den Ergebnissen von Studien in *Xenopus* Eizelllinien überein, in welchen gezeigt werden konnte, dass der MRN-Komplex und aNHEJ gemeinsam, in einem parallelen Weg zu TDP2, in der TOP2cc Reparatur agieren (Chandramouly *et al.*, 2021). Die Hypothese, dass der DSB nach der WSS1A vermittelten Proteolyse von TOP2 in Pflanzen durch aNHEJ repariert wird, wird dadurch gestärkt, dass die *lig4 wss1A* Doppelmutante einen synergistischen Effekt bezüglich ihrer Eto-Sensitivität aufwies, was darauf hindeutet, dass WSS1A und der cNHEJ Mechanismus in unterschiedlichen Wegen der TOP2cc Reparatur agieren (Abbildung 3.17). Da der cNHEJ Mechanismus jedoch auch unabhängig von TDP2 in die TOP2cc Reparatur involviert ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein kleiner Teil der DSB-Intermediate die bei der WSS1A vermittelten Proteolyse von TOP2 entstehen, auch durch fehlerhaftes cNHEJ repariert werden. Im

Rahmen dieser Arbeit sollte zur Kontrolle dieser Hypothese auch eine *teb wss1A* Mutante auf ihre Sensitivität gegen Eto untersucht werden. Diese wies jedoch überraschenderweise so starke morphologische Defekte auf, dass sie keinen Sensitivitätsanalysen unterzogen werden konnte (Abbildung 3.18 und 3.19). Durch weitere Analysen der *wss1A* Mutante wurde dieser Phänotyp im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht und die Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieser unabhängig von der jeweiligen Funktion der beiden Faktoren in der TOP2cc Reparatur auftritt (Erläuterung Abschnitt 4.3). Durch die bereits vorliegenden Ergebnisse der TOP2cc Reparatur ist dennoch anzunehmen, dass der DSB nach der WSS1A vermittelten Proteolyse durch das fehlerbehaftete aNHEJ repariert wird, während der glatte DSB, der durch die TDP2 vermittelte Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zwischen TOP2 und der DNA generiert wird, voraussichtlich fehlerfrei durch cNHEJ geschlossen werden kann (Abbildung 4.1). Dementsprechend scheint TDP2 das Pflanzengenom zu schützen, indem es die fehlerfreie Reparatur von TOP2cc garantiert.

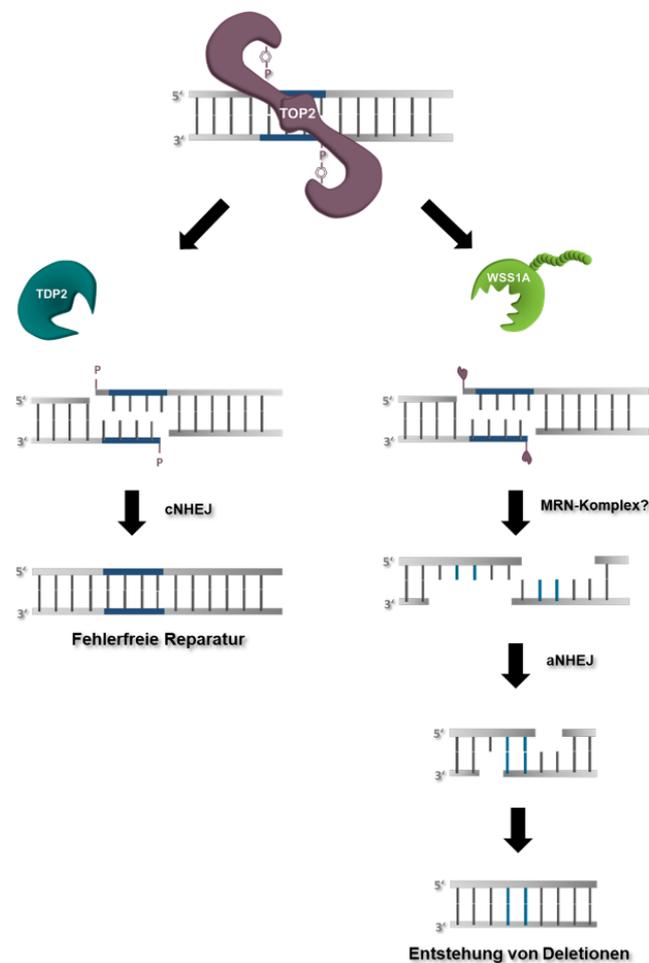


Abbildung 4.1: Modell der TOP2cc Reparatur in Pflanzen

Kovalente TOP2cc können in Pflanzen durch zwei unterschiedliche Wege repariert werden. TDP2 kann die Phosphodiesterbindung zwischen TOP2 und der DNA hydrolysieren und somit einen glatten DSB mit einer 5'-Phosphat- und einer 3'-OH-Gruppe generieren. Dieser kann nachfolgend fehlerfrei durch den klassischen *non-homologous end joining* (cNHEJ) Mechanismus geschlossen werden. Alternativ kann TOP2 durch die WSS1A vermittelte Proteolyse entfernt werden. Dabei bleiben jedoch Peptidreste an den 5'-Enden des DSB zurück, welche zunächst durch den MRN-Komplex entfernt werden müssen, wodurch ein DSB mit längeren 3'-Überhängen entsteht. Dieser wird anschließend durch den fehlerbehafteten alternativen *non-homologous end joining* (aNHEJ) Weg repariert.

Es ist jedoch noch unbekannt, wann welcher Reparaturweg eingeschlagen wird. Bezüglich der Regulation von WSS1A, wurde in Hefe gezeigt, dass ScWss1 für seine enzymatische Aktivität aktiviert werden muss. Hierfür müssen die SIM-Domänen von ScWss1 mit SUMO-Resten in Berührung kommen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit der Zellzyklus-Segregase Cdc48 in Hefezellen für die Funktion von ScWss1 notwendig ist (Stingele *et al.*, 2014). Für die Aktivität von HsTDP2 wurde hingegen postuliert, dass das Substrat ubiquitiniert vorliegen muss, damit es mit der UBA-Domäne von TDP2 interagieren kann (Pommier *et al.*, 2014). Ein Defekt in der UBA-Domäne von HsTDP2 bewirkt eine starke Beeinträchtigung in der TOP2cc Reparaturfunktion. (Rao *et al.*, 2016). Ob dies auch für die Aktivierung in Pflanzen zutrifft ist fraglich, da das pflanzliche Homolog über zwei Zinkfinger-RanBP2 Domänen statt einer UBA-Domäne verfügt (Confalonieri *et al.*, 2014). Doch auch für die Zinkfinger-RanBP2 Domänen konnte gezeigt werden, dass sie über die Fähigkeit verfügen Ubiquitin binden zu können (Wang *et al.*, 2003; Alam *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2011). Es wäre daher möglich, dass der TOP2cc für die Funktion von AtTDP2 ubiquitiniert vorliegen muss. Durch *in vitro* Studien mit Zellextrakten von Vertebraten, konnte gezeigt werden, dass TOP2cc während der Replikation, aber auch Replikations-unabhängig sowohl sumoyliert als auch ubiquitiniert werden und somit sowohl für die Proteolyse durch SPRTN/Wss1, als auch für die *crosslink* Hydrolyse durch TDP2, zugänglich gemacht werden (Mao *et al.*, 2001; Nakano *et al.*, 2009; Larsen *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021). Hinsichtlich der Signalgebung von TOP2cc scheint daher kein Unterschied in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus vorzuliegen. Allgemein wird den funktionellen Homologen von WSS1A aus Metazoen und aus Hefe jedoch eine besondere Rolle in der Reparatur von replikationsassoziierten Schäden zugeschrieben (Stingele *et al.*, 2014; Vaz *et al.*, 2016; Ruggiano & Ramadan, 2021). Das funktionelle Homolog SPRTN aus Metazoen wird vorwiegend während der S-Phase exprimiert und unterliegt verschiedenen posttranslationalen Modifikationen, welche die Aktivität während der Replikation begünstigen (Maskey *et al.*, 2014). Im inaktiven Zustand ist SPRTN in der C-terminalen UBZ Domäne monoubiquitiniert. Erst die Deubiquitinierung durch die Ubiquitin-Protease USP11 aktiviert das Enzym und ermöglicht die Interaktion mit dem Chromatin (Perry *et al.*, 2020). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des C-Terminus durch die *checkpoint* Kinase CHK1 bewirkt, dass SPRTN verstärkt zum Chromatin rekrutiert wird (Halder *et al.*, 2019). Während der Replikation kann SPRTN mit der Ringklemme interagieren und dabei durch die gleichzeitige Interaktion mit einzelsträngiger DNA den Abbau des Fremdproteins bewirken (Stingele *et al.*, 2016; Vaz *et al.*, 2016). Weitere Studien in Metazoen weisen jedoch daraufhin, dass SPRTN auch außerhalb der Replikation in die DPC Reparatur involviert ist. Das entsprechende Homolog von *Drosophila melanogaster* lokalisierte bereits vor der Replikation an den Schadstellen und die Abwesenheit des entsprechenden Homologs von *Caenorhabditis elegans* führte auch replikationsunabhängig zu einer verstärkten Sensitivität gegen Formaldehyd (Delabaere *et al.*, 2014; Stingele *et al.*, 2016). Bei SPRTN handelt es sich jedoch nur um ein funktionelles Homolog und kein direktes Ortholog, weshalb sich die Erkenntnisse aus Tieren nur bedingt auf die Funktion von WSS1A übertragen lassen (Reinking *et al.*,

2020a). Studien in Hefe zeigten, dass ScWss1, das direkte Homolog von WSS1A, Zellzyklus-unabhängig stets zu einem geringen Level exprimiert wird (Kwesi Sam, 2020). Bisherige Studien in Hefe weisen jedoch daraufhin, dass auch ScWss1 speziell während der Replikation von besonderer Bedeutung ist, wenn DPCs vor dem Eintritt in die Replikation nicht rechtzeitig durch kanonische DNA-Reparaturmechanismen repariert wurden (Stingele *et al.*, 2014). Da es sich bei WSS1A um eine Protease mit einem weiten Substratspektrum handelt, ist zu erwarten, dass es wie bei SPRTN weitere, bislang noch unbekannte Ebenen der Regulation bedarf, die die enzymatische Aktivität zeitlich und substratspezifisch begrenzen. Da WSS1A im Gegensatz zu ScWss1 über eine C-terminale UBZ Domäne verfügt, wäre es möglich, dass sie wie SPRTN ebenfalls erst durch Ubiquitin-Ligasen aktiviert werden muss (Reinking *et al.*, 2020a). Da die Reparatur von TOP2cc durch WSS1A mit einem Informationsverlust assoziiert ist, könnte vermutet werden, dass WSS1A vor allem während der Replikation, unter Zeitnot, aktiviert wird und dann für die Entfernung von TOP2 zuständig ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, dass WSS1A speziell während der Replikation, von großer Bedeutung ist. Die spezifische Rolle von WSS1A in der replikativen DNA Reparatur wird im folgenden Abschnitt genauer erläutert. TDP2 ist dagegen mehr für seine Funktion in der Reparatur von transkriptionsassoziierten TOP2cc bekannt und agiert deshalb potentiell vornehmlich in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus (Gómez-Herreros *et al.*, 2014; Gómez-Herreros *et al.*, 2017).

4.3 DIE FUNKTION VON WSS1A BEI DER AUFRECHTERHALTUNG DER GENOMSTABILITÄT

Erst kürzlich, wurde die Protease WSS1A in Pflanzen charakterisiert und ihre Funktion in der pflanzlichen DNA-Reparatur analysiert. Dabei wurde in Sensitivitätsanalysen demonstriert, dass WSS1A, wie auch das Homolog aus Hefe, in die pflanzliche DPC Reparatur involviert ist, da die Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegen die DPC induzierenden Genotoxine CPT und Cisplatin aufwiesen. Während Hefe $\Delta wss1$ Mutanten jedoch keine Wachstumsdefekte aufwiesen und nur mit einem zusätzlichen Defekt in *Tdp1* eine verstärkte Sensitivität gegen CPT zeigten, wiesen pflanzliche *wss1A* Mutanten schwere Entwicklungsdefizite auf (Mullen *et al.*, 2010; Stingele *et al.*, 2014; Enderle *et al.*, 2019). Dies zeichnete sich durch einen fasziierten Phänotyp, stark reduziertes Wurzelwachstum und eine drastisch reduzierte Fertilität aus (Enderle, 2019; Enderle *et al.*, 2019). Obwohl auch für die Endonuklease MUS81 ähnlich wichtige Funktionen in der pflanzlichen DPC-Reparatur nachgewiesen werden konnten und diese zudem noch in die Inter- und Intrastrang-DNA-*crosslink* Reparatur involviert ist, weisen *mus81* Mutanten einen weitaus mildereren Phänotyp mit einem normalen Wuchsphänotyp und einer weniger stark reduzierten Wurzellänge auf (Hartung *et al.*, 2006; Mannuss *et al.*, 2010; Enderle *et al.*, 2019). Dies deutet darauf hin, dass WSS1A eine globalere Rolle in der Aufrechterhaltung der pflanzlichen Genomintegrität einnimmt.

Um die genetische Interaktion in der TOP2cc Reparatur zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Doppelmutante mit einem simultanen Defekt in sowohl *WSS1A*, als auch dem aNHEJ Faktor *POLQ*, generiert. Diese Doppelmutante wies jedoch starke morphologische Defekte auf und zeigte im Vergleich zu *wss1A* Einzelmutante eine nochmals drastischer reduzierte Wurzellänge, eine stark verminderte Keimungsrate, einen fragilen Wuchstyp und eine signifikant reduzierte Fertilität (Abbildung 3.18 und 3.19). Dies war ein überraschendes Ergebnis, da die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hindeuten, dass *WSS1A* und *POLQ* in einem gemeinsamen Weg bei der TOP2cc Reparatur agieren, während *TDP2* und *LIG4* in einem parallelen Weg wirken. Der Phänotyp der *teb wss1A* Mutante deutet jedoch eher darauf hin, dass ein Faktor den Verlust des jeweils anderen kompensieren kann und dass die beiden Faktoren somit in unterschiedlichen Wegen der DNA Reparatur agieren. Obwohl auch die Ergebnisse einer Eto-Sensitivitätsanalyse darauf hinwiesen, dass *WSS1A* und *LIG4* in unterschiedlichen Wegen der TOP2cc Reparatur agieren, fiel der Phänotyp der *lig4 wss1A* Doppelmutante weitaus milder aus. Die Doppelmutante wies einen ähnlichen Wuchstyp wie die *wss1A* Einzelmutante auf, zeigte jedoch eine im Vergleich zu *wss1A* signifikant reduzierte Wurzellänge.

Diese Analysen wiesen bereits auf wichtige Funktionen von *WSS1A* im Erhalt der pflanzlichen Genomstabilität hin. Um diese Funktion von *WSS1A* näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit NHEJ- und *wss1A* Mutanten auf somatische Anaphasendefekte hin untersucht. Auf diese Weise können chromosomale Instabilitäten direkt auf zytologischer Ebene detektiert werden. Hierbei können grundsätzlich zwei verschiedene Arten von Schäden auftreten. Bei Anaphasebrücken handelt es sich um dizentrische Chromosomen - fusionierte homologe Chromosomen oder Schwesterchromatide - welche infolge einer fehlerhaften Ligation bei der Reparatur von replikativen DSB entstehen (Bertuch, 2002; Puizina *et al.*, 2004; Fernández-Casañas & Chan, 2018). Bei Chromosomenfragmenten handelt es sich um azentrische Chromosomenbruchstücke, einen Schaden der durch die unzureichende Reparatur von replikativen DSB entsteht (Kuzminov, 2001; Puizina *et al.*, 2004). Während die beiden NHEJ Mutanten *lig4* und *teb* keine signifikant erhöhte Anzahl an defekten Anaphasen im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, zeigte die *wss1A* Mutante überraschenderweise eine im Vergleich zum Wildtyp etwa viermal so hohe Anzahl an defekten Anaphasen (Abbildung 3.20). Bei etwa 75 % der detektierten Defekte in *wss1A* handelte es sich um Chromosomenfragmentierungen. Da es sich bei diesem Defekt um unzureichend reparierte replikative DSBs handelt, ist dies ein klares Indiz, dass in der *wss1A* Mutante entweder ein Defekt in der DSB Reparatur vorliegt, oder dass durch die Abwesenheit von *WSS1A* vermehrt replikative DSBs entstehen. Bei einer Funktion in der DSB-Reparatur wäre es möglich, dass *WSS1A* Proteine von den Enden des DSBs entfernt und diesen somit vorbereitet auf die nachfolgende DSB Reparatur durch NHEJ. In Bezug auf die Funktion in der TOP2cc Reparatur konnte bereits gezeigt werden, dass *WSS1A* fähig ist Proteine von DSB Enden zu entfernen und diese für das nachfolgende aNHEJ zu präparieren. Dabei wäre es denkbar, dass entweder der cNHEJ oder der aNHEJ Mechanismus durch die vorherige Aktivität von *WSS1A* stärker begünstigt werden würde. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden mithilfe des CRISPR/Cas-Systems kürzlich sowohl im Wildtyp, als auch in der

wss1A Mutante, Brüche in vier verschiedenen Loci in eu- und heterochromatischen Regionen induziert. Durch *next generation sequencing* wurde anschließend die DSB Reparatur in den verschiedenen Regionen analysiert. Wenn WSS1A entweder die Reparatur durch cNHEJ oder aNHEJ begünstigen würde, wäre zwischen dem Wildtyp und der *wss1A* Mutante ein unterschiedliches Reparaturmuster (Größe und Position der Insertionen und Deletionen) zu erwarten gewesen, da die DSB Reparatur durch aNHEJ in größeren Deletionen resultiert, als die DSB Reparatur durch cNHEJ. Die Analyse zeigte jedoch, dass die *wss1A* Mutante das gleiche DSB-Reparaturmuster wie der Wildtyp aufwies (unveröffentlichte Daten Niklas Capdeville). Dementsprechend scheint WSS1A keine Funktion in der DSB Reparatur zu haben. Das bedeutet, dass WSS1A wahrscheinlich eher die Entstehung von replikativen DSB vorbeugt. Auch in menschlichen Zellkulturen konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie in Abwesenheit von SPRTN vermehrt 53BP1 Foci detektiert werden, welche ein Marker für DSBs sind (Vaz *et al.*, 2016). Dies wurde ebenfalls dahingehend interpretiert, dass SPRTN durch die Entfernung des DPCs den Zusammenbruch der Replikationsgabel verhindert und somit die Entstehung von replikationsassoziierten DSB verhindert. Die weitere Analyse der somatischen Anaphasendefekte zeigte, dass der simultane Verlust von WSS1A und dem cNHEJ Faktor LIG4 nur in einer leicht, aber nicht signifikant erhöhten Anzahl an defekten Anaphasen im Vergleich zur *wss1A* Mutante resultierte, während der simultane Verlust von WSS1A und dem aNHEJ Faktor POLQ zu einem drastischen Anstieg in der Anzahl der defekten Anaphasen führte. Dabei war jeweils vor allem der Anteil der Chromosomenfragmentationen stark erhöht. In der *teb wss1A* Mutante lag der Gesamtanteil an defekten Anaphasen bei etwa 15 % und war damit etwa dreimal so hoch wie bei der *wss1A* Mutante. Dies korreliert mit dem Phänotyp der Mutante und deutet darauf hin, dass POLQ in Abwesenheit von WSS1A für die replikationsassoziierten Schadensreparatur benötigt wird. In Abwesenheit von WSS1A werden Replikationsgabeln, die durch einen DPC blockiert werden, vorwiegend durch die Endonuklease MUS81 prozessiert. Aufgrund des erhöhten Replikationsstress, wäre es auch möglich, dass die Replikationsgabeln vermehrt kollabieren. Sowohl durch den Zusammenbruch der Replikationsgabel, als auch durch die Prozessierung durch MUS81 entsteht ein einseitiger DSB, der durch das fehlende zweite Ende nicht durch NHEJ geschlossen werden kann. In Hefe spielt in der Reparatur solcher einseitigen DSB die *break induced replication* (BIR) eine wichtige Rolle. Durch Mechanismen der HR wird bei der BIR der Versuch gestartet die Replikation fortzuführen und die Replikationsgabel gegebenenfalls wiederherzustellen. Durch das fehlende zweite Ende kann der neu synthetisierte Strang jedoch auch hier mit keinem zweiten Ende verknüpft werden. Das hat zur Folge, dass das 3'-Ende des einseitigen DSB immer wieder in das komplementäre DNA-Molekül einwandert, wodurch es zu Fehlern in Form von Duplikationen, Deletionen und chromosomalen Translokationen kommen kann (Deem *et al.*, 2011; Anand *et al.*, 2013). Ob es diesen Mechanismus auch in Pflanzen gibt, ist noch nicht vollständig geklärt, aber Studien aus der Ackerbohne deuten darauf hin, dass er, falls er vorhanden wäre, eher eine untergeordnete Rolle spielt (Schubert *et al.*, 2011). Studien in Säugern konnten dagegen zeigen, dass kollabierte Replikationsgabeln oft nicht wieder neu

gestartet werden können (Petermann *et al.*, 2010). Erst durch die Ankunft der konvergierenden Replikationsgabel wird ein zweites DSB Ende in räumliche Nähe gebracht, mit welchem der bereits bestehende einseitige DSB verknüpft werden kann. Sowohl in humanen Zellkulturen, als auch in *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass der aNHEJ Mechanismus bei der Reparatur von replikationsassoziierten DSB eine wichtige Rolle spielt, da die 5'-Enden dieses zweiseitigen DSB vermutlich resektiert sind und somit nicht durch cNHEJ verknüpft werden können (Wang *et al.*, 2019; Nisa *et al.*, 2021). Dies steht auch im Einklang mit Ergebnissen dieser Arbeit, in welchen demonstriert werden konnte, dass MUS81 und aNHEJ in einem gemeinsamen Weg in der TOP1cc Reparatur agieren (Abbildung 3.21, Erläuterung in Abschnitt 4.2.1). In Abwesenheit von WSS1A steigt die Anzahl der replikationsassoziierten DSBs dementsprechend vermutlich stark an und könnte die Kapazität des aNHEJs überstrapazieren, alle Brüche rechtzeitig zu reparieren, bevor die Zelle in die Mitose eintritt. Dies würde die drastische Anzahl an Chromosomenfragmentationen in der *teb wss1A* Doppelmutante erklären. Das bedeutet, dass WSS1A ein enorm wichtiger Faktor in der replikativen Schadensreparatur ist, da es in der Lage ist, einen Protein-assoziierten Schaden direkt von der DNA zu entfernen, wodurch das Fortschreiten der Replikationsgabel sichergestellt und die Bildung von replikativen DSB verhindert wird (Abbildung 4.2)..

Die Theorie, dass WSS1A eine wichtige Rolle in der Erhaltung der replikationsassoziierten Genomstabilität spielt, stimmt auch mit den Ergebnissen einer Doktorarbeit überein, in welcher gezeigt werden konnte, dass die *wss1A* Mutante, im Vergleich zum Wildtyp, eine signifikant reduzierte Anzahl an 45S rDNA *repeats* aufweist (Feller, 2021). Die Anzahl der 45S rDNA *repeats* ist ein sensibler Marker für die replikationsassoziierte Genomstabilität. Die Replikation von 45S rDNA-*repeats* ist aufgrund der Bildung von Sekundärstrukturen, wie G-Quadruplexen, fehleranfälliger und zeitaufwändiger als bei anderen Teilen des Genoms (Kobayashi, 2008). In Hefe konnte bereits gezeigt werden, dass die Anzahl der rDNA *repeats* stark durch Replikationsstress beeinflusst wird. Mutanten mit einer Beeinträchtigung in der DNA-Replikation, wiesen meist eine reduzierte Anzahl an rDNA *repeats* auf (Salim *et al.*, 2017). Hierbei wird vermutet, dass eine Reduktion der rDNA *repeats* dabei helfen kann Replikationsprobleme auszugleichen, zumindest solange die Proteinsynthese gewährleistet bleibt. Da rDNA *repeats* nichts zwangsläufig mit DPCs assoziiert sind, deutet dies darauf hin, dass WSS1A auch außerhalb der DPC Reparatur in die replikationsassoziierte Schadenstoleranz involviert ist. Um dieser Hypothese nachzugehen, sollte die genetische Interaktion von WSS1A mit der Helikase RECQ4A untersucht werden. Die Helikase RECQ4A ist ein Bestandteil des pflanzlichen RTR-Komplexes, welcher vor allem für seine Funktion in der Dissolution von dHJs bekannt ist, die stets in einem *non-crossover* Produkt resultiert. Außerhalb der Funktion als dHJ Dissolvasom konnten für RECQ4A jedoch auch wichtige replikative Funktionen nachgewiesen werden. So ist RECQ4A unter anderem an der Regression von Replikationsgabeln beteiligt und leistet dadurch einen wichtigen Beitrag zur Wiederherstellung der Replikationsgabel nach DNA-Schäden (Schröpfer *et al.*, 2014b). Für das

menschliche Homolog BLM konnte zudem eine Funktion in der Auflösung von G-Quadruplexen nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 2015).

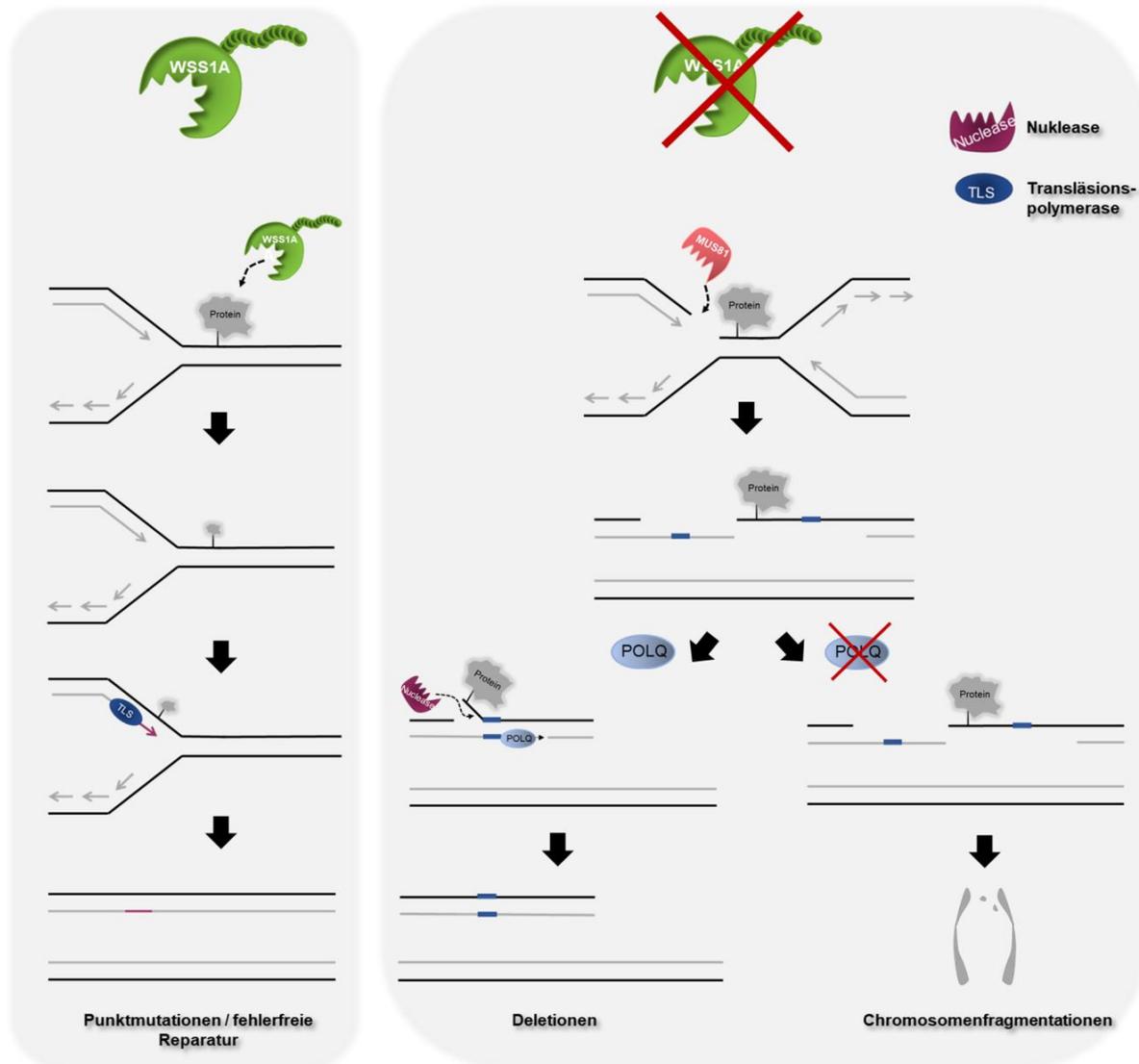


Abbildung 4.2: WSS1A beugt der Entstehung von replikativen Doppelstrangbrüchen vor.

In Anwesenheit von WSS1A kann ein Protein-assoziiertes Schaden an der Replikationsgabel direkt durch WSS1A abgebaut werden. Dadurch bleibt nur ein kleiner Peptidrest, der im Folgenden durch die Transläsionssynthese umgangen werden kann, weshalb die Schadensreparatur in Anwesenheit von WSS1A in einer fehlerfreien Reparatur, oder in der Entstehung von kleinen Punktmutationen resultiert. In Abwesenheit von WSS1A prozessieren vermehrt Nucleasen wie MUS81 die Replikationsgabel, oder es kommt zum Zusammenbruch der Replikationsgabel. Dadurch entsteht ein einseitiger DSB, der erst durch die konvergierende Replikationsgabel in die Reichweite eines zweiten DSB Endes gebracht wird. Die 5'-Enden dieses DSB sind durch verstärkte Aktivität von Nucleasen in der S-Phase resektiert und können daher nur durch aNHEJ, mithilfe von POLQ erfolgreich repariert werden. DPCs die an den 3'-Enden noch vorhanden sind, können dann durch strukturspezifische Nucleasen entfernt werden. Die DSB Reparatur durch aNHEJ ist jedoch assoziiert mit der Entstehung von Deletionen. In Abwesenheit von POLQ, kann der replikative DSB nicht durch aNHEJ repariert werden. Wenn der Schaden auch durch weitere DSB-Reparaturmechanismen nicht vor dem Eintritt in die Mitose repariert wird, resultiert dies in chromosomalen Fragmentationen.

Um zu testen ob RECQ4A und WSS1A überschneidende Funktionen in der replikativen Schadenstoleranz haben, sollte durch Kreuzung eine Mutante mit einem simultanen Defekt in beiden Faktoren generiert werden. Überraschenderweise konnte jedoch auch nach der Genotypisierung der F3-Generation keine homozygote Doppelmutante identifiziert werden. Durch eine Embryoanalyse wurde ersichtlich, dass die Doppelmutante embryolethal ist und bereits früh in der Entwicklung nicht mehr lebensfähig war (Abbildung 3.22). Diese Beobachtung steht im Einklang mit Studien in Hefe und *C. elegans*, in welchen gezeigt werden konnte, dass ein simultaner Verlust der entsprechenden Homologe Wss1/DVC1 und Sgs1/HIM6 in einer verminderten Lebensfähigkeit resultiert (Mullen *et al.*, 2010; Stingle *et al.*, 2016). Um zu untersuchen ob dies allein durch die replikative Funktion von RECQ4A oder durch die Funktion im RTR-Komplex bedingt ist, sollten weitere Mutanten generiert werden, die sowohl einen Defekt in WSS1A als auch einem weiteren RTR-Komplex Partner aufwiesen. Neben RECQ4A besteht der RTR-Komplex in Pflanzen aus der Topoisomerase TOP3 α und den Strukturproteinen RMI1 und RMI2. Abseits der gemeinsamen Funktion im RTR-Komplex, sind die einzelnen Faktoren auch unabhängig voneinander in unterschiedliche zellulären Prozesse involviert (Knoll *et al.*, 2014b). Während für RECQ4A wichtige Funktionen in der Replikation nachgewiesen werden konnten, sind TOP3 α und RMI1 in die Auflösung komplexer *Joint molecules*, die während der Meiose entstehen, involviert (Hartung *et al.*, 2008). Für RMI2 konnte nur in Abwesenheit weiterer wichtiger Reparaturfaktoren eine Funktion in der DNA-Reparatur und im Erhalt der rDNA Stabilität nachgewiesen werden (Röhrig *et al.*, 2016). Genau wie bei einem simultanen Verlust von RECQ4A und WSS1A, führte auch der gleichzeitige Defekt in WSS1A und RMI1 zu einer frühen Embryolethalität (Abbildung 8.2). Auch bei einem simultanen Defekt in entweder WSS1A und TOP3 α , oder WSS1A und RMI2 konnte keine Doppelmutante identifiziert werden, obwohl jeweils Doppelmutanten, die bereits homozygot in einem Faktor waren, weiteretabliert wurden, wodurch die Wahrscheinlichkeit eine Doppelmutante zu identifizieren laut mendelscher Segregation bei 25 % liegen sollte (unveröffentlichte Daten Annika Dorn und Laura Feller). Dementsprechend wird in Abwesenheit von WSS1A der gesamte RTR-Komplex essentiell benötigt um die Zellvitalität in Arabidopsis zu garantieren. In verschiedensten Studien konnte gezeigt werden, dass auch der simultane Verlust von RECQ4A und der Endonuklease MUS81, welche parallel zu WSS1A in der DPC Reparatur agiert, sowohl in Arabidopsis, als auch in anderen Organismen in einer synthetischen Letalität resultiert (Boddy *et al.*, 2000; Mullen *et al.*, 2001; Hartung *et al.*, 2006; Trowbridge *et al.*, 2007). Im Vergleich zur *recq4A wss1A* Mutante, keimten die *recq4A mus81* Mutanten jedoch und waren erst nach wenigen Wochen nicht mehr lebensfähig (Hartung *et al.*, 2006). Durch die heterologe Expression der Endonuklease RusA, oder durch die Ausschaltung der HR, konnte die synthetische Letalität der *recq4A mus81* Mutante wieder aufgehoben werden, weshalb dies dahingehend interpretiert wurde, dass sich in Abwesenheit beider Faktoren toxische Rekombinationsintermediate akkumulierten (Mannuss *et al.*, 2010; Dorn *et al.*, 2018). Im Gegensatz zu *rmi2 wss1A* Mutanten, wiesen *rmi2 mus81* Mutanten keine synthetische Letalität auf und zeigten lediglich einen starken synergistische Effekt bei der Behandlung mit Cisplatin, woraus geschlossen

wurde, dass RMI2 unabhängig von MUS81 in die Auflösung von Rekombinationsintermediaten involviert ist, aber nicht so essentiell für diese Funktion benötigt wird wie RECQ4A (Röhrig *et al.*, 2016). Dieser Effekt ist dementsprechend vor allem auf die Funktion des RTR-Komplexes in der Dissolution von Rekombinationsintermediaten zurückzuführen, welche sich mit der Funktion von MUS81 in der Resolution von Rekombinationsintermediaten, überschneidet. Durch die enzymatische Aktivität als Protease, ist es eher unwahrscheinlich, dass WSS1A auch in der Auflösung von Rekombinationsintermediaten beteiligt ist, außer wenn diese einen Proteinanteil aufweisen, der zuvor abgebaut werden muss. Dementsprechend scheint die beobachtete Embryoletalität zwischen WSS1A und den RTR-Komplex Partnern auf eine weitere Funktion des RTR-Komplexes, abseits der Funktion in der Dissolution, zurückzuführen sein. Erst kürzlich konnte in humanen Zellkulturen gezeigt werden, dass der menschliche BTR-Komplex eine essentielle Rolle bei der Wiederherstellung von blockierten Replikationsgabeln spielt. Sowohl RMI1, als auch das RECQ4A Homolog BLM können mit RPA interagieren und erkennen dabei lange DNA Einzelstränge, die zusammen mit dem Einzelstrangbindeprotein RPA ein Nukleoproteinfilament bilden. Kurze einzelsträngige DNA-Sequenzen die nur wenige RPA Moleküle binden, werden hingegen nicht erkannt. Auf diese Weise wird der BTR-Komplex gezielt zu angehaltenen Replikationsgabeln rekrutiert und ist dann auch an der Wiederaufnahme der Replikation beteiligt. Hierbei wird vermutet, dass der RTR-Komplex rekrutiert wird um spezifische Rekombinationsintermediate, oder Sekundärstrukturen wie G-Quadruplexe, die die Replikation blockieren, aufzulösen (Shorrocks *et al.*, 2021). Da die Interaktion der RecQ Helikasen mit RPA und anderen Einzelstrangbindeproteinen von Prokaryoten bis zu höheren Eukaryoten hochkonserviert ist, wäre es schlüssig, wenn der RTR-Komplex in Pflanzen eine ähnliche Funktion erfüllt (Li *et al.*, 2004; Lecoite *et al.*, 2007; Shorrocks *et al.*, 2021). In Hefe konnte unterdessen gezeigt werden, dass ScWss1 neben der Funktion in der Beseitigung von replikationsassoziierten DPCs, auch in den Schutz angehaltener Replikationsgabeln involviert ist. Dies bewirkt es indem es Histone abbaut, die unspezifisch an den langen einzelsträngigen DNA-Sequenzen angehaltener Replikationsgabeln binden und so die Wiederaufnahme der Replikation erschweren (Maddi *et al.*, 2020). Eine mögliche Erklärung für die beobachtete synthetische Embryoletalität könnte daher sein, dass WSS1A und der RTR-Komplex, in Abwesenheit des anderen Faktors, jeweils essentiell sind für die Aufrechterhaltung und den Neustart von Replikationsgabeln. Das bedeutet, dass WSS1A zusätzlich zur Funktion in der Beseitigung von kovalenten DPCs vermutlich auch in der Protektion von angehaltenen Replikationsgabeln involviert wird ist und so ebenfalls die Entstehung von replikativen DSB verhindert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

DNA-Protein-*crosslinks* (DPC) stellen eine große Gefahr für die Genomintegrität dar, da sie essentielle zelluläre Prozesse wie die Transkription, die Replikation, oder die Rekombination sterisch behindern. Topoisomerase 2 *cleavage complexes* (TOP2cc) stellen einen besonders schwerwiegenden und komplexen DNA-Schaden dar, da das Protein, die Topoisomerase 2, bei diesem Typus von DPC mit einem Doppelstrangbruch (DSB) assoziiert ist. Dementsprechend bedarf es mindestens zwei verschiedener Schritte um diese Art von DPC zu reparieren. Im ersten Schritt muss zunächst der Proteinanteil entfernt werden, damit in einem zweiten Schritt der verbleibende DSB geschlossen werden kann. In Säugern wurde die TOP2cc Reparatur bereits näher charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 2 (TDP2) eine zentrale Rolle in der TOP2cc Reparatur einnimmt.

In dieser Arbeit wurde das pflanzliche TDP2 Homolog erstmals auf seine Funktion in der DNA-Reparatur charakterisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass TDP2 spezifisch in der pflanzlichen TOP2cc Reparatur agiert und dass es, im Gegensatz zum Homolog aus Säugern, nicht in die TOP1cc Reparatur involviert ist. Weiterhin konnte durch Doppelmutantenanalysen gezeigt werden, dass die Protease WSS1A parallel zu TDP2 in der TOP2cc Reparatur agiert. Im Gegensatz dazu, scheint die Endonuklease MUS81, welche der Hauptfaktor in der pflanzlichen TOP1cc Reparatur ist, nur eine untergeordnete Rolle in der TOP2cc Reparatur zu spielen und für die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) konnte keine Funktion in der pflanzlichen TOP2cc Reparatur nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der DSB nach TDP2 vermittelter Entfernung von TOP2 durch den klassischen *non-homologous end joining* (*classical* NHEJ, cNHEJ) Mechanismus fehlerfrei repariert werden kann, während der DSB nach der WSS1A vermittelter Proteolyse von TOP2 durch den fehlerbehafteten alternativen NHEJ (aNHEJ) Mechanismus prozessiert wird. Somit schützt TDP2 die Integrität des Pflanzengenoms durch die fehlerfreie Reparatur von TOP2cc.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Protease WSS1A eine essenzielle Rolle in der Reparatur replikationsassoziiertter Schäden einnimmt und dadurch der Entstehung von replikativen DSB vorbeugt. Hierbei ist WSS1A sowohl an der Entfernung Protein-assoziiertter Schäden beteiligt, wodurch die Kontinuität der Replikation gewährleistet wird, als auch am Schutz der angehaltenen Replikationsgabel.

6. SUMMARY

DNA-protein crosslinks (DPCs) pose a major threat to genome integrity, as they form a steric hindrance for essential cellular processes such as transcription, replication, or recombination. Topoisomerase 2 cleavage complexes (TOP2cc) represent a particularly severe and complex DNA damage because the protein, topoisomerase 2, is associated with a double-strand break (DSB) in this DPC type. Accordingly, it takes at least two different steps to repair this type of DPC. In the first step, the protein part must be removed so that the remaining DSB can be closed in a second step. In mammals, TOP2cc repair has already been characterized in more detail and it could be shown that tyrosyl DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) plays a central role in TOP2cc repair.

In this thesis, the plant TDP2 homologue was characterized for its function in DNA repair for the first time. It was shown that TDP2 acts specifically in plant TOP2cc repair and that, in contrast to the mammalian homologue, it is not involved in TOP1cc repair. Furthermore, double mutant analyses revealed that the protease WSS1A acts in parallel to TDP2 in TOP2cc repair. In contrast, the endonuclease MUS81, which is the main factor in TOP1cc repair in plants, seems to play only a minor role in TOP2cc repair, and for tyrosyl DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) no function in plant TOP2cc repair could be assigned. In addition, it could be shown that the DSB after TDP2-mediated removal of TOP2 can be repaired error-free by the classical non-homologous end joining (classical NHEJ, cNHEJ) mechanism, whereas the DSB after WSS1A-mediated proteolysis of TOP2 is processed by the error-prone alternative NHEJ (aNHEJ) mechanism. Thus, TDP2 protects plant genome integrity by the error-free repair of TOP2cc.

Furthermore, this work elucidated that the protease WSS1A plays an essential role in the repair of replication-associated damage and thus prevents the development of replicative DSB. Thereby, WSS1A is involved both in the removal of protein-associated damage, thereby ensuring the continuity of replication, and in the protection of the arrested replication fork.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Akimitsu N, Adachi N, Hirai H, Hossain MS, Hamamoto H, Kobayashi M, Aratani Y, Koyama H, Sekimizu K. 2003.** Enforced cytokinesis without complete nuclear division in embryonic cells depleting the activity of DNA topoisomerase IIalpha. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **8**: 393–402.
- Alam SL, Sun J, Payne M, Welch BD, Blake BK, Davis DR, Meyer HH, Emr SD, Sundquist WI. 2004.** Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *The EMBO Journal* **23**: 1411–1421.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R et al. 2003.** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Anand RP, Lovett ST, Haber JE. 2013.** Break-induced DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**: a010397.
- Aparicio T, Baer R, Gottesman M, Gautier J. 2016.** MRN, CtIP, and BRCA1 mediate repair of topoisomerase II-DNA adducts. *The Journal of cell biology* **212**: 399–408.
- Armstrong SJ, Sanchez-Moran E, Franklin FCH. 2009.** Cytological analysis of *Arabidopsis thaliana* meiotic chromosomes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **558**: 131–145.
- Atkinson J, McGlynn P. 2009.** Replication fork reversal and the maintenance of genome stability. *Nucleic acids research* **37**: 3475–3492.
- Babiychuk E, Cottrill PB, Storozhenko S, Fuangthong M, Chen Y, O'Farrell MK, van Montagu M, Inzé D, Kushnir S. 1998.** Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerases. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **15**: 635–645.
- Barber LJ, Youds JL, Ward JD, McIlwraith MJ, O'Neil NJ, Petalcorin MIR, Martin JS, Collis SJ, Cantor SB, Auclair M et al. 2008.** RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. *Cell* **135**: 261–271.
- Barthelmes HU, Habermeyer M, Christensen MO, Mielke C, Interthal H, Pouliot JJ, Boege F, Marko D. 2004.** TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II. *The Journal of biological chemistry* **279**: 55618–55625.
- Bender RP, Jablonksy MJ, Shadid M, Romaine I, Dunlap N, Anklin C, Graves DE, Osheroff N. 2008.** Substituents on etoposide that interact with human topoisomerase IIalpha in the binary enzyme-drug complex: contributions to etoposide binding and activity. *Biochemistry* **47**: 4501–4509.
- Berchowitz LE, Francis KE, Bey AL, Copenhaver GP. 2007.** The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS genetics* **3**: e132.
- Bernstein DA, Keck JL. 2005.** Conferring substrate specificity to DNA helicases: role of the RecQ HRDC domain. *Structure (London, England : 1993)* **13**: 1173–1182.
- Bertuch AA. 2002.** Telomeres: The Molecular Events Driving End-To-End Fusions. *Current Biology* **12**: R738-R740.

- Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S, Goodarzi AA, Krempler A, Jeggo PA, Löbrich M. 2009.** ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO Journal* **28**: 3413–3427.
- Beying N, Schmidt C, Pacher M, Houben A, Puchta H. 2020.** CRISPR-Cas9-mediated induction of heritable chromosomal translocations in *Arabidopsis*. *Nature plants* **6**: 638–645.
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R. 2011.** CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics* **45**: 273–297.
- Blastyák A, Pintér L, Unk I, Prakash L, Prakash S, Haracska L. 2007.** Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Molecular cell* **28**: 167–175.
- Bocquet N, Bizard AH, Abdulrahman W, Larsen NB, Faty M, Cavadini S, Bunker RD, Kowalczykowski SC, Cejka P, Hickson ID *et al.* 2014.** Structural and mechanistic insight into Holliday-junction dissolution by topoisomerase III α and RMI1. *Nature structural & molecular biology* **21**: 261–268.
- Boddy MN, Lopez-Girona A, Shanahan P, Interthal H, Heyer WD, Russell P. 2000.** Damage tolerance protein Mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase Cds1. *Molecular and cellular biology* **20**: 8758–8766.
- Bonnet S, Knoll A, Hartung F, Puchta H. 2013.** Different functions for the domains of the *Arabidopsis thaliana* RMI1 protein in DNA cross-link repair, somatic and meiotic recombination. *Nucleic acids research* **41**: 9349–9360.
- Boscá S, Knauer S, Laux T. 2011.** Embryonic development in *Arabidopsis thaliana*: from the zygote division to the shoot meristem. *Frontiers in plant science* **2**: 93.
- Britt AB. 1996.** DNA damage and repair in plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **47**: 75–100.
- Budzowska M, Kanaar R. 2009.** Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. *Cell biochemistry and biophysics* **53**: 17–31.
- Bythell-Douglas R, Deans AJ. 2021.** A Structural Guide to the Bloom Syndrome Complex. *Structure (London, England : 1993)* **29**: 99–113.
- Cannan WJ, Pederson DS. 2016.** Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *Journal of cellular physiology* **231**: 3–14.
- Cejka P, Cannavo E, Polaczek P, Masuda-Sasa T, Pokharel S, Campbell JL, Kowalczykowski SC. 2010.** DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature* **467**: 112–116.
- Cejka P, Plank JL, Dombrowski CC, Kowalczykowski SC. 2012.** Decatenation of DNA by the *S. cerevisiae* Sgs1-Top3-Rmi1 and RPA complex: a mechanism for disentangling chromosomes. *Molecular cell* **47**: 886–896.

- Chandramouly G, Liao S, Rusanov T, Borisonnik N, Calbert ML, Kent T, Sullivan-Reed K, Vekariya U, Kashkina E, Skorski T et al. 2021.** Polθ promotes the repair of 5'-DNA-protein crosslinks by microhomology-mediated end-joining. *Cell reports* **34**: 108820.
- Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. 2017.** Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature reviews. Molecular cell biology* **18**: 495–506.
- Chiang S-C, Carroll J, El-Khamisy SF. 2010.** TDP1 serine 81 promotes interaction with DNA ligase IIIα and facilitates cell survival following DNA damage. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **9**: 588–595.
- Ciaccio C, Castello R, Esposito S, Pinelli M, Nigro V, Casari G, Chiapparini L, Pantaleoni C, D'Arrigo S. 2019.** Consolidating the Role of TDP2 Mutations in Recessive Spinocerebellar Ataxia Associated with Pediatric Onset Drug Resistant Epilepsy and Intellectual Disability (SCAR23). *Cerebellum (London, England)* **18**: 972–975.
- Clough SJ, Bent AF. 1998.** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **16**: 735–743.
- Cohen SM, Lippard SJ. 2001.** Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy. In: Elsevier, 93–130.
- Confalonieri M, Carelli M, Tava A, Borrelli L. 2019.** Overexpression of MtTdp2α (tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2) gene confers salt tolerance in transgenic *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **137**: 157–172.
- Confalonieri M, Faè M, Balestrazzi A, Donà M, Macovei A, Valassi A, Giraffa G, Carbonera D. 2014.** Enhanced osmotic stress tolerance in *Medicago truncatula* plants overexpressing the DNA repair gene MtTdp2α (tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **116**: 187–203.
- Constantin N, Dzantiev L, Kadyrov FA, Modrich P. 2005.** Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction. *The Journal of biological chemistry* **280**: 39752–39761.
- Cortes Ledesma F, El Khamisy SF, Zuma MC, Osborn K, Caldecott KW. 2009.** A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature* **461**: 674–678.
- Daley JM, Jimenez-Sainz J, Wang W, Miller AS, Xue X, Nguyen KA, Jensen RB, Sung P. 2017.** Enhancement of BLM-DNA2-Mediated Long-Range DNA End Resection by CtIP. *Cell reports* **21**: 324–332.
- Das BB, Antony S, Gupta S, Dexheimer TS, Redon CE, Garfield S, Shiloh Y, Pommier Y. 2009.** Optimal function of the DNA repair enzyme TDP1 requires its phosphorylation by ATM and/or DNA-PK. *The EMBO Journal* **28**: 3667–3680.
- Deem A, Keszthelyi A, Blackgrove T, Vayl A, Coffey B, Mathur R, Chabes A, Malkova A. 2011.** Break-induced replication is highly inaccurate. *PLoS biology* **9**: e1000594.

- Delabaere L, Orsi GA, Sapey-Triomphe L, Horard B, Couble P, Loppin B. 2014.** The Spartan ortholog maternal haploid is required for paternal chromosome integrity in the *Drosophila* zygote. *Current biology : CB* **24**: 2281–2287.
- Desai SD, Li TK, Rodriguez-Bauman A, Rubin EH, Liu LF. 2001.** Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer research* **61**: 5926–5932.
- Deshpande RA, Lee J-H, Arora S, Paull TT. 2016.** Nbs1 Converts the Human Mre11/Rad50 Nuclease Complex into an Endo/Exonuclease Machine Specific for Protein-DNA Adducts. *Molecular cell* **64**: 593–606.
- Deweese JE, Osheroff N. 2009.** The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic acids research* **37**: 738–748.
- Dokshin GA, Davis GM, Sawle AD, Eldridge MD, Nicholls PK, Gourley TE, Romer KA, Molesworth LW, Tatnell HR, Ozturk AR et al. 2020.** GCNA Interacts with Spartan and Topoisomerase II to Regulate Genome Stability. *Developmental cell* **52**: 53-68.e6.
- Dorn A, Röhrig S, Papp K, Schröpfer S, Hartung F, Knoll A, Puchta H. 2018.** The topoisomerase 3 α zinc-finger domain T1 of *Arabidopsis thaliana* is required for targeting the enzyme activity to Holliday junction-like DNA repair intermediates. *PLoS genetics* **14**: e1007674.
- Doudna JA, Charpentier E. 2014.** Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**: 1258096.
- Dynan WS, Yoo S. 1998.** Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic acids research* **26**: 1551–1559.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. 2004.** Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**: 457–463.
- Ellis NA, Groden J, Ye T-Z, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, Proytcheva M, German J. 1995.** The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* **83**: 655–666.
- Enderle J. 2019.** *DNA-Protein-Crosslink-Reparatur in Arabidopsis thaliana*. Doktorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe.
- Enderle J, Dorn A, Beying N, Trapp O, Puchta H. 2019.** The Protease WSS1A, the Endonuclease MUS81, and the Phosphodiesterase TDP1 Are Involved in Independent Pathways of DNA-protein Crosslink Repair in Plants. *The Plant cell* **31**: 775–790.
- Errichiello E, Zagnoli-Vieira G, Rizzi R, Garavelli L, Caldecott KW, Zuffardi O. 2020.** Characterization of a novel loss-of-function variant in TDP2 in two adult patients with spinocerebellar ataxia autosomal recessive 23 (SCAR23). *Journal of human genetics* **65**: 1135–1141.
- Escribano-Díaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Xing M, Young JTF, Tkáč J, Cook MA, Rosebrock AP, Munro M, Canny MD et al. 2013.** A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Molecular cell* **49**: 872–883.

- Faè M, Balestrazzi A, Confalonieri M, Donà M, Macovei A, Valassi A, Giraffa G, Carbonera D. 2014.** Copper-mediated genotoxic stress is attenuated by the overexpression of the DNA repair gene *MtTdp2 α* (tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2) in *Medicago truncatula* plants. *Plant cell reports* **33**: 1071–1080.
- Fasching CL, Cejka P, Kowalczykowski SC, Heyer W-D. 2015.** Top3-Rmi1 dissolve Rad51-mediated D loops by a topoisomerase-based mechanism. *Molecular cell* **57**: 595–606.
- Felix CA, Kolaris CP, Osheroff N. 2006.** Topoisomerase II and the etiology of chromosomal translocations. *DNA Repair* **5**: 1093–1108.
- Feller L. 2021.** *Die Rolle der Polymerase Q für den Erhalt der Genomstabilität in Arabidopsis thaliana.* Doktorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe.
- Fernández-Casañas M, Chan K-L. 2018.** The Unresolved Problem of DNA Bridging. *Genes* **9**.
- Fricke WM, Bastin-Shanower SA, Brill SJ. 2005.** Substrate specificity of the *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 endonuclease. *DNA Repair* **4**: 243–251.
- Fulcher N, Sablowski R. 2009.** Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 20984–20988.
- Gaillard P-HL, Noguchi E, Shanahan P, Russell P. 2003.** The Endogenous Mus81-Eme1 Complex Resolves Holliday Junctions by a Nick and Counternick Mechanism. *Molecular cell* **12**: 747–759.
- Gao R, Schellenberg MJ, Huang SN, Abdelmalak M, Marchand C, Nitiss KC, Nitiss JL, Williams RS, Pommier Y. 2014.** Proteolytic degradation of topoisomerase II (Top2) enables the processing of Top2-DNA and Top2-RNA covalent complexes by tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 2 (TDP2). *The Journal of biological chemistry* **289**: 17960–17969.
- Garcia V, Phelps SEL, Gray S, Neale MJ. 2011.** Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* **479**: 241–244.
- Geisinger JM, Turan S, Hernandez S, Spector LP, Calos MP. 2016.** In vivo blunt-end cloning through CRISPR/Cas9-facilitated non-homologous end-joining. *Nucleic acids research* **44**: e76.
- German J. 1993.** Bloom Syndrome: A Mendelian Prototype of Somatic Mutational Disease. *Medicine* **72**.
- Geuting V, Kobbe D, Hartung F, Dürr J, Focke M, Puchta H. 2009.** Two distinct MUS81-EME1 complexes from Arabidopsis process Holliday junctions. *Plant physiology* **150**: 1062–1071.
- Gibson EG, King MM, Mercer SL, Dewese JE. 2016.** Two-Mechanism Model for the Interaction of Etoposide Quinone with Topoisomerase II α . *Chemical research in toxicology* **29**: 1541–1548.
- Gillet LCJ, Schärer OD. 2006.** Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chemical reviews* **106**: 253–276.
- Gómez-Herreros F, Romero-Granados R, Zeng Z, Alvarez-Quilón A, Quintero C, Ju L, Umans L, Vermeire L, Huylebroeck D, Caldecott KW *et al.* 2013.** TDP2-dependent non-homologous end-joining protects against topoisomerase II-induced DNA breaks and genome instability in cells and in vivo. *PLoS genetics* **9**: e1003226.

- Gómez-Herreros F, Schuurs-Hoeijmakers JHM, McCormack M, Grealley MT, Rulten S, Romero-Granados R, Counihan TJ, Chaila E, Conroy J, Ennis S et al. 2014.** TDP2 protects transcription from abortive topoisomerase activity and is required for normal neural function. *Nature genetics* **46**: 516–521.
- Gómez-Herreros F, Zagnoli-Vieira G, Ntai I, Martínez-Macías MI, Anderson RM, Herrero-Ruiz A, Caldecott KW. 2017.** TDP2 suppresses chromosomal translocations induced by DNA topoisomerase II during gene transcription. *Nature communications* **8**: 233.
- Goodarzi AA, Yu Y, Riballo E, Douglas P, Walker SA, Ye R, Härer C, Marchetti C, Morrice N, Jeggo PA et al. 2006.** DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *The EMBO Journal* **25**: 3880–3889.
- Graaf B de, Clore A, McCullough AK. 2009.** Cellular pathways for DNA repair and damage tolerance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks. *DNA Repair* **8**: 1207–1214.
- Gu J, Li S, Zhang X, Wang L-C, Niewolik D, Schwarz K, Legerski RJ, Zandi E, Lieber MR. 2010.** DNA-PKcs regulates a single-stranded DNA endonuclease activity of Artemis. *DNA Repair* **9**: 429–437.
- Gu J, Lu H, Tippin B, Shimazaki N, Goodman MF, Lieber MR. 2007.** XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *The EMBO Journal* **26**: 1010–1023.
- Hacker L, Dorn A, Puchta H. 2020.** Repair of DNA-protein crosslinks in plants. *DNA Repair* **87**: 102787.
- Halder S, Torrecilla I, Burkhalter MD, Popović M, Fielden J, Vaz B, Oehler J, Pilger D, Lessel D, Wiseman K et al. 2019.** SPRTN protease and checkpoint kinase 1 cross-activation loop safeguards DNA replication. *Nature communications* **10**: 3142.
- Hanada K, Budzowska M, Modesti M, Maas A, Wyman C, Essers J, Kanaar R. 2006.** The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks. *The EMBO Journal* **25**: 4921–4932.
- Hanawalt PC, Spivak G. 2008.** Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**: 958–970.
- Hande K. 1998.** Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer* **34**: 1514–1521.
- Hartsuiker E, Neale MJ, Carr AM. 2009.** Distinct requirements for the Rad32(Mre11) nuclease and Ctp1(CtIP) in the removal of covalently bound topoisomerase I and II from DNA. *Molecular cell* **33**: 117–123.
- Hartung F, Suer S, Bergmann T, Puchta H. 2006.** The role of AtMUS81 in DNA repair and its genetic interaction with the helicase AtRecQ4A. *Nucleic acids research* **34**: 4438–4448.
- Hartung F, Suer S, Knoll A, Wurz-Wildersinn R, Puchta H. 2008.** Topoisomerase 3alpha and RMI1 suppress somatic crossovers and are essential for resolution of meiotic recombination intermediates in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* **4**: e1000285.

- Hartung F, Suer S, 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 of the United States of America* **104**: 18836–18841.
- Hays JB. 2002.** *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair* **1**: 579–600.
- Hicks JK, Chute CL, Paulsen MT, Ragland RL, Howlett NG, Guéranger Q, Glover TW, Canman CE. 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**: 1217–1230.
- Hoegge C, Pfander B, Moldovan G-L, Pyrowolakis G, Jentsch S. 2002.** RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**: 135–141.
- Holliday R. 1964.** A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical Research* **5**: 282–304.
- Holloway JK, Booth J, Edelman W, McGowan CH, Cohen PE. 2008.** MUS81 generates a subset of MLH1-MLH3-independent crossovers in mammalian meiosis. *PLoS genetics* **4**: e1000186.
- Hsiang YH, Lihou MG, Liu LF. 1989.** Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer research* **49**: 5077–5082.
- Hudson JJR, Chiang S-C, Wells OS, Rookyard C, El-Khamisy SF. 2012.** SUMO modification of the neuroprotective protein TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair. *Nature communications* **3**: 733.
- Ide H, Nakano T, Salem AMH, Shoulkamy MI. 2018.** DNA-protein cross-links: Formidable challenges to maintaining genome integrity. *DNA Repair* **71**: 190–197.
- Ide H, Shoulkamy MI, Nakano T, Miyamoto-Matsubara M, Salem AMH. 2011.** Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks. *Mutation research* **711**: 113–122.
- Inagaki S, Suzuki T, Ohto M, Urawa H, Horiuchi T, Nakamura K, Morikami A. 2006.** Arabidopsis TEBICHI, with helicase and DNA polymerase domains, is required for regulated cell division and differentiation in meristems. *The Plant cell* **18**: 879–892.
- Interthal H, Champoux JJ. 2011.** Effects of DNA and protein size on substrate cleavage by human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *The Biochemical journal* **436**: 559–566.
- Interthal H, Heyer WD. 2000.** MUS81 encodes a novel helix-hairpin-helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics : MGG* **263**: 812–827.
- Jentsch S, Psakhye I. 2013.** Control of nuclear activities by substrate-selective and protein-group SUMOylation. *Annual review of genetics* **47**: 167–186.
- Jia Q, Dulk-Ras A den, Shen H, Hooykaas PJJ, Pater S de. 2013.** Poly(ADP-ribose)polymerases are involved in microhomology mediated back-up non-homologous end joining in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* **82**: 339–351.

- Jilani A, Ramotar D, Slack C, Ong C, Yang XM, Scherer SW, Lasko DD. 1999.** Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *The Journal of biological chemistry* **274**: 24176–24186.
- Jiricny J. 2006.** The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**: 335–346.
- Kadyk LC, Hartwell LH. 1992.** Sister Chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **132**: 387–402.
- Kanellis P, Gagliardi M, Banath JP, Szilard RK, Nakada S, Galicia S, Sweeney FD, Cabelof DC, Olive PL, Durocher D. 2007.** A screen for suppressors of gross chromosomal rearrangements identifies a conserved role for PLP in preventing DNA lesions. *PLoS genetics* **3**: e134.
- Kato T, Todo T, Ayaki H, Ishizaki K, Morita T, Mitra S, Ikenaga M. 1994.** Cloning of a marsupial DNA photolyase gene and the lack of related nucleotide sequences in placental mammals. *Nucleic acids research* **22**: 4119–4124.
- Kawale AS, Povirk LF. 2018.** Tyrosyl-DNA phosphodiesterases: rescuing the genome from the risks of relaxation. *Nucleic acids research* **46**: 520–537.
- Kelso AA, Waldvogel SM, Luthman AJ, Sehorn MG. 2017.** Homologous Recombination in Protozoan Parasites and Recombinase Inhibitors. *Frontiers in microbiology* **8**: 1716.
- Kimura S, Sakaguchi K. 2006.** DNA Repair in Plants. *Chemical reviews* **106**: 753–766.
- King MLS, Sullivan MM. 1946.** The similarity of the effect of podophyllin and colchicine and their use in the treatment of condylomata acuminata. *Science* **104**: 244–245.
- Klemm T, Mannuß A, Kobbe D, Knoll A, Trapp O, Dorn A, Puchta H. 2017.** The DNA translocase RAD5A acts independently of the other main DNA repair pathways, and requires both its ATPase and RING domain for activity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **91**: 725–740.
- Knoll A, Fauser F, Puchta H. 2014a.** DNA recombination in somatic plant cells: mechanisms and evolutionary consequences. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **22**: 191–201.
- Knoll A, Schröpfer S, Puchta H. 2014b.** The RTR complex as caretaker of genome stability and its unique meiotic function in plants. *Frontiers in plant science* **5**: 33.
- Kobayashi T. 2008.** A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus--rDNA instability maintains genome integrity. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **30**: 267–272.
- Koncz C, Kreuzaler F, Kalman Z, 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**: 1029–1037.

- Krokan HE, Bjørås M. 2013.** Base excision repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**: a012583.
- Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schär P, Barnes DE, Lindahl T. 1996.** Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *The EMBO Journal* **15**: 6662–6670.
- Kunkel TA. 2004.** DNA replication fidelity. *The Journal of biological chemistry* **279**: 16895–16898.
- Kuzminov A. 2001.** DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 8461–8468.
- Kwesi Sam D. 2020.** *The Role and Molecular Mechanisms of Wss1 in Preserving Genomic Stability*, South Dakota State University.
- Larsen NB, Gao AO, Sparks JL, Gallina I, Wu RA, Mann M, Räsche M, Walter JC, Duxin JP. 2019.** Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair by SPRTN and the Proteasome in *Xenopus* Egg Extracts. *Molecular cell* **73**: 574-588.e7.
- Lecointe F, Sérène C, Velten M, Costes A, McGovern S, Meile J-C, Errington J, Ehrlich SD, Noiroit P, Polard P. 2007.** Anticipating chromosomal replication fork arrest: SSB targets repair DNA helicases to active forks. *The EMBO Journal* **26**: 4239–4251.
- Lessel D, Vaz B, Halder S, Lockhart PJ, Marinovic-Terzic I, Lopez-Mosqueda J, Philipp M, Sim JCH, Smith KR, Oehler J *et al.* 2014.** Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features. *Nature genetics* **46**: 1239–1244.
- Li C, Sun S-Y, Khuri FR, Li R. 2011.** Pleiotropic functions of EAPII/TTRAP/TDP2: cancer development, chemoresistance and beyond. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **10**: 3274–3283.
- Li W, Kim S-M, Lee J, Dunphy WG. 2004.** Absence of BLM leads to accumulation of chromosomal DNA breaks during both unperturbed and disrupted S phases. *The Journal of cell biology* **165**: 801–812.
- Li W, Wang JC. 1998.** Mammalian DNA topoisomerase IIIalpha is essential in early embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1010–1013.
- Li X, Heyer W-D. 2008.** Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research* **18**: 99–113.
- Liao S, Tammaro M, Yan H. 2016.** The structure of ends determines the pathway choice and Mre11 nuclease dependency of DNA double-strand break repair. *Nucleic acids research* **44**: 5689–5701.
- Lieber MR. 2010.** The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry* **79**: 181–211.
- Lippke JA, Gordon LK, Brash DE, Haseltine WA. 1981.** Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 3388–3392.

- Liu C, Pouliot JJ, Nash HA. 2002.** Repair of topoisomerase I covalent complexes in the absence of the tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 14970–14975.
- Liu C-H, Finke A, Díaz M, Rozhon W, Poppenberger B, Baubec T, Pecinka A. 2015.** Repair of DNA Damage Induced by the Cytidine Analog Zebularine Requires ATR and ATM in Arabidopsis. *The Plant cell* **27**: 1788–1800.
- Liu D, Keijzers G, Rasmussen LJ. 2017.** DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutation research* **773**: 174–187.
- Liu JCY, Kühbacher U, Larsen NB, Borgermann N, Garvanska DH, Hendriks IA, Ackermann L, Haahr P, Gallina I, Guérillon C et al. 2021.** Mechanism and function of DNA replication-independent DNA-protein crosslink repair via the SUMO-RNF4 pathway. *The EMBO Journal*: e107413.
- Lopez-Mosqueda J, Maddi K, Prgomet S, Kalayil S, Marinovic-Terzic I, Terzic J, Dikic I. 2016.** SPRTN is a mammalian DNA-binding metalloprotease that resolves DNA-protein crosslinks. *eLife* **5**.
- Macovei A, Faè M, Biggiogera M, Sousa Araújo S de, Carbonera D, Balestrazzi A. 2018.** Ultrastructural and Molecular Analyses Reveal Enhanced Nucleolar Activity in *Medicago truncatula* Cells Overexpressing the MtTdp2a Gene. *Frontiers in plant science* **9**: 596.
- Maddi K, Sam DK, Bonn F, Prgomet S, Tulowetzke E, Akutsu M, Lopez-Mosqueda J, Dikic I. 2020.** Wss1 Promotes Replication Stress Tolerance by Degrading Histones. *Cell reports* **30**: 3117-3126.e4.
- Mankouri HW, Hickson ID. 2007.** The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome'? *Trends in Biochemical Sciences* **32**: 538–546.
- Mannuss A, Dukowic-Schulze S, Suer S, Hartung F, Pacher M, 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* **22**: 3318–3330.
- Manthei KA, Keck JL. 2013.** The BLM dissolvasome in DNA replication and repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **70**: 4067–4084.
- Mao Y, Desai SD, Ting CY, Hwang J, Liu LF. 2001.** 26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *The Journal of biological chemistry* **276**: 40652–40658.
- Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ. 2014.** Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**: 465–481.
- Martin GM, Smith AC, Ketterer DJ, Ogburn CE, Disteche CM. 1985.** Increased chromosomal aberrations in first metaphases of cells isolated from the kidneys of aged mice. *Israel journal of medical sciences* **21**: 296–301.

- Masani S, Han L, Meek K, Yu K. 2016.** Redundant function of DNA ligase 1 and 3 in alternative end-joining during immunoglobulin class switch recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: 1261–1266.
- Maskey RS, Kim MS, Baker DJ, Childs B, Malureanu LA, Jeganathan KB, Machida Y, van Deursen JM, Machida YJ. 2014.** Spartan deficiency causes genomic instability and progeroid phenotypes. *Nature communications* **5**: 5744.
- Mattaj IW, Englmeier L. 1998.** Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annual review of biochemistry* **67**: 265–306.
- Meijer M, Karimi-Busheri F, Huang TY, Weinfeld M, Young D. 2002.** Pnk1, a DNA kinase/phosphatase required for normal response to DNA damage by gamma-radiation or camptothecin in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry* **277**: 4050–4055.
- Mengoli V, Bucciarelli E, Lattao R, Piergentili R, Gatti M, Bonaccorsi S. 2014.** The analysis of mutant alleles of different strength reveals multiple functions of topoisomerase 2 in regulation of *Drosophila* chromosome structure. *PLoS genetics* **10**: e1004739.
- Mercier R, Mézard C, Jenczewski E, Macaisne N, Grelon M. 2015.** The molecular biology of meiosis in plants. *Annual review of plant biology* **66**: 297–327.
- Mimitou EP, Symington LS. 2008.** Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**: 770–774.
- Mimori T, Hardin JA. 1986.** Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *The Journal of biological chemistry* **261**: 10375–10379.
- Morozov V, Mushegian AR, Koonin EV, Bork P. 1997.** A putative nucleic acid-binding domain in Bloom's and Werner's syndrome helicases. *Trends in Biochemical Sciences* **22**: 417–418.
- Mosbech A, Gibbs-Seymour I, Kagias K, Thorslund T, Beli P, Povlsen L, Nielsen SV, Smedegaard S, Sedgwick G, Lukas C *et al.* 2012.** DVC1 (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks. *Nature structural & molecular biology* **19**: 1084–1092.
- Mullen JR, Chen C-F, Brill SJ. 2010.** Wss1 is a SUMO-dependent isopeptidase that interacts genetically with the Slx5-Slx8 SUMO-targeted ubiquitin ligase. *Molecular and cellular biology* **30**: 3737–3748.
- Mullen JR, Kaliraman V, Ibrahim SS, Brill SJ. 2001.** Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**: 103–118.
- Mullen JR, Nallaseth FS, Lan YQ, Slagle CE, Brill SJ. 2005.** Yeast Rmi1/Nce4 controls genome stability as a subunit of the Sgs1-Top3 complex. *Molecular and cellular biology* **25**: 4476–4487.
- Murai J, Huang SN, Das BB, Dexheimer TS, Takeda S, Pommier Y. 2012.** Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) repairs DNA damage induced by topoisomerases I and II and base alkylation in vertebrate cells. *The Journal of biological chemistry* **287**: 12848–12857.

- Nakano T, Katafuchi A, Matsubara M, Terato H, Tsuboi T, Masuda T, Tatsumoto T, Pack SP, Makino K, Croteau DL et al. 2009.** Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **284**: 27065–27076.
- Nakano T, Morishita S, Katafuchi A, Matsubara M, Horikawa Y, Terato H, Salem AMH, Izumi S, Pack SP, Makino K et al. 2007.** Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks. *Molecular cell* **28**: 147–158.
- Nakano T, Xu X, Salem AMH, Shoulkamy MI, Ide H. 2017.** Radiation-induced DNA-protein cross-links: Mechanisms and biological significance. *Free radical biology & medicine* **107**: 136–145.
- Nassif N, Penney J, Pal S, Engels WR, Gloor GB. 1994.** Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Molecular and cellular biology* **14**: 1613–1625.
- Nguyen CD, Mansfield RE, Leung W, Vaz PM, Loughlin FE, Grant RP, Mackay JP. 2011.** Characterization of a family of RanBP2-type zinc fingers that can recognize single-stranded RNA. *Journal of molecular biology* **407**: 273–283.
- Nick McElhinny SA, Havener JM, Garcia-Diaz M, Juárez R, Bebenek K, Kee BL, Blanco L, Kunkel TA, Ramsden DA. 2005.** A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Molecular cell* **19**: 357–366.
- Nick McElhinny SA, Ramsden DA. 2003.** Polymerase mu is a DNA-directed DNA/RNA polymerase. *Molecular and cellular biology* **23**: 2309–2315.
- Nimonkar AV, Genschel J, Kinoshita E, Polaczek P, Campbell JL, Wyman C, Modrich P, Kowalczykowski SC. 2011.** BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes & development* **25**: 350–362.
- Nisa M, Bergis C, Pedroza-Garcia J-A, Drouin-Wahbi J, Mazubert C, Bergounioux C, Benhamed M, Raynaud C. 2021.** The plant DNA polymerase theta is essential for the repair of replication-associated DNA damage. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **106**: 1197–1207.
- Nitiss KC, Malik M, He X, White SW, Nitiss JL. 2006.** Tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) participates in the repair of Top2-mediated DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 8953–8958.
- Osman F, Dixon J, Doe CL, Whitby MC. 2003.** Generating Crossovers by Resolution of Nicked Holliday Junctions. *Molecular cell* **12**: 761–774.
- Osman K, Higgins JD, Sanchez-Moran E, Armstrong SJ, Franklin FCH. 2011.** Pathways to meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist* **190**: 523–544.
- Pardo B, Moriel-Carretero M, Vicat T, Aguilera A, Pasero P. 2020.** Homologous recombination and Mus81 promote replication completion in response to replication fork blockage. *EMBO reports* **21**: e49367.

- Pepe A, West SC. 2014.** Substrate specificity of the MUS81-EME2 structure selective endonuclease. *Nucleic acids research* **42**: 3833–3845.
- Perry M, Kollala SS, Biegert M, Su G, Kodavati M, Mallard H, Kreiling N, Holbrook A, Ghosal G. 2020.** USP11 deubiquitinates monoubiquitinated SPRTN to repair DNA-protein crosslinks.
- Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T. 2010.** Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Molecular cell* **37**: 492–502.
- Pfeifer GP. 1997.** Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochemistry and photobiology* **65**: 270–283.
- Plo I. 2003.** Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA Repair* **2**: 1087–1100.
- Pommier Y, Huang SN, Gao R, Das BB, Murai J, Marchand C. 2014.** Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair* **19**: 114–129.
- Pouliot JJ, Robertson CA, Nash HA. 2001.** Pathways for repair of topoisomerase I covalent complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **6**: 677–687.
- Pouliot JJ, Yao KC, Robertson CA, Nash HA. 1999.** Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science* **286**: 552–555.
- Pryor JM, Waters CA, Aza A, Asagoshi K, Strom C, Mieczkowski PA, Blanco L, Ramsden DA. 2015.** Essential role for polymerase specialization in cellular nonhomologous end joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: E4537-45.
- Psakhye I, Jentsch S. 2012.** Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* **151**: 807–820.
- Puchta H. 1998.** Repair of genomic double-strand breaks in somatic plant cells by one-sided invasion of homologous sequences. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **13**: 331–339.
- Puchta H. 2005.** The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of experimental botany* **56**: 1–14.
- Puchta H, Fauser F. 2014.** Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **78**: 727–741.
- Puizina J, Siroky J, Mokros P, Schweizer D, Riha K. 2004.** Mre11 deficiency in Arabidopsis is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis. *The Plant cell* **16**: 1968–1978.
- Qi Y, Li X, Zhang Y, Starker CG, Baltes NJ, Zhang F, Sander JD, Reyon D, Joung JK, Voytas DF. 2013.** Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *G3 (Bethesda, Md.)* **3**: 1707–1715.

- Quievryn G, Zhitkovich A. 2000.** Loss of DNA–protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis* **21**: 1573–1580.
- Rao T, Gao R, Takada S, Al Abo M, Chen X, Walters KJ, Pommier Y, Aihara H. 2016.** Novel TDP2-ubiquitin interactions and their importance for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *Nucleic acids research* **44**: 10201–10215.
- Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. 2010.** Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of nucleic acids* **2010**: 592980.
- Regairaz M, Zhang Y-W, Fu H, Agama KK, Tata N, Agrawal S, Aladjem MI, Pommier Y. 2011.** Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *The Journal of cell biology* **195**: 739–749.
- Reinking HK, Hofmann K, Stingle J. 2020a.** Function and evolution of the DNA-protein crosslink proteases Wss1 and SPRTN. *DNA Repair* **88**: 102822.
- Reinking HK, Kang H-S, Götz MJ, Li H-Y, Kieser A, Zhao S, Acampora AC, Weickert P, Fessler E, Jae LT et al. 2020b.** DNA Structure-Specific Cleavage of DNA-Protein Crosslinks by the SPRTN Protease. *Molecular cell* **80**: 102-113.e6.
- Robert I, Dantzer F, Reina-San-Martin B. 2009.** Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *The Journal of experimental medicine* **206**: 1047–1056.
- Röhrig S, Schröpfer S, Knoll A, Puchta H. 2016.** The RTR Complex Partner RMI2 and the DNA Helicase RTEL1 Are Both Independently Involved in Preserving the Stability of 45S rDNA Repeats in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* **12**: e1006394.
- Roldán-Arjona T, Ariza RR, Córdoba-Cañero D. 2019.** DNA Base Excision Repair in Plants: An Unfolding Story With Familiar and Novel Characters. *Frontiers in plant science* **10**: 1055.
- Rosso MG, Li Y, Strizhov N, Reiss B, Dekker K, Weisshaar B. 2003.** An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant molecular biology* **53**: 247–259.
- Ruggiano A, Ramadan K. 2021.** DNA-protein crosslink proteases in genome stability. *Communications biology* **4**: 11.
- Sale JE. 2013.** Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**: a012708.
- Salim D, Bradford WD, Freeland A, Cady G, Wang J, Pruitt SC, Gerton JL. 2017.** DNA replication stress restricts ribosomal DNA copy number. *PLoS genetics* **13**: e1007006.
- Salomon S, Puchta H. 1998.** Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *The EMBO Journal* **17**: 6086–6095.

- Samach A, Melamed-Bessudo C, Avivi-Ragolski N, Pietrokovski S, Levy AA. 2011.** Identification of plant RAD52 homologs and characterization of the *Arabidopsis thaliana* RAD52-like genes. *The Plant cell* **23**: 4266–4279.
- San Filippo J, Sung P, Klein H. 2008.** Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual review of biochemistry* **77**: 229–257.
- Sancar A. 1994.** Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* **33**: 2–9.
- Schärer OD. 2013.** Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**: a012609.
- Schellenberg MJ, Lieberman JA, Herrero-Ruiz A, Butler LR, Williams JG, Muñoz-Cabello AM, Mueller GA, London RE, Cortés-Ledesma F, Williams RS. 2017.** ZATT (ZNF451)-mediated resolution of topoisomerase 2 DNA-protein cross-links. *Science* **357**: 1412–1416.
- Schmidt C, Pacher M, Puchta H. 2019.** Efficient induction of heritable inversions in plant genomes using the CRISPR/Cas system. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **98**: 577–589.
- Schröpfer S, Knoll A, Trapp O, Puchta H. 2014a.** DNA Repair and Recombination in Plants. In: Howell SH, ed. *Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 51–93.
- Schröpfer S, Kobbe D, Hartung F, Knoll A, Puchta H. 2014b.** Defining the roles of the N-terminal region and the helicase activity of RECQ4A in DNA repair and homologous recombination in *Arabidopsis*. *Nucleic acids research* **42**: 1684–1697.
- Schubert I, Schubert V, Fuchs J. 2011.** No evidence for "break-induced replication" in a higher plant - but break-induced conversion may occur. *Frontiers in plant science* **2**: 8.
- Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. 2019.** DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature reviews. Molecular cell biology* **20**: 698–714.
- Seeliger K, Dukowic-Schulze S, Wurz-Wildersinn R, Pacher M, Puchta H. 2012.** BRCA2 is a mediator of RAD51- and DMC1-facilitated homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist* **193**: 364–375.
- Selak N, Bachrati CZ, Shevelev I, Dietschy T, van Loon B, Jacob A, Hübscher U, Hoheisel JD, Hickson ID, Stagljar I. 2008.** The Bloom's syndrome helicase (BLM) interacts physically and functionally with p12, the smallest subunit of human DNA polymerase delta. *Nucleic acids research* **36**: 5166–5179.
- Serbyn N, Noireterre A, Bagdiul I, Plank M, Michel AH, Loewith R, Kornmann B, Stutz F. 2020.** The Aspartic Protease Ddi1 Contributes to DNA-Protein Crosslink Repair in Yeast. *Molecular cell* **77**: 1066-1079.e9.
- Shorrocks A-MK, Jones SE, Tsukada K, Morrow CA, Belblidia Z, Shen J, Vendrell I, Fischer R, Kessler BM, Blackford AN. 2021.** The Bloom syndrome complex senses RPA-coated single-stranded DNA to restart stalled replication forks. *Nature communications* **12**: 585.

- Shuman S, Kane EM, Morham SG. 1989.** Mapping the active-site tyrosine of vaccinia virus DNA topoisomerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 9793–9797.
- Singh TR, Ali AM, Busygina V, Raynard S, Fan Q, Du C, Andreassen PR, Sung P, Meetei AR. 2008.** BLAP18/RMI2, a novel OB-fold-containing protein, is an essential component of the Bloom helicase-double Holliday junction dissolvasome. *Genes & development* **22**: 2856–2868.
- Smirnoff N. 2005.** Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Solomon MJ, Varshavsky A. 1985.** Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 6470–6474.
- Stark JM, Pierce AJ, Oh J, Pastink A, Jasin M. 2004.** Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Molecular and cellular biology* **24**: 9305–9316.
- Steinert J, Schiml S, Fauser F, Puchta H. 2015.** Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **84**: 1295–1305.
- Stelter P, Ulrich HD. 2003.** Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**: 188–191.
- Stingle J, Bellelli R, Alte F, Hewitt G, Sarek G, Maslen SL, Tsutakawa SE, Borg A, Kjær S, Tainer JA et al. 2016.** Mechanism and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair by the DNA-Dependent Metalloprotease SPRTN. *Molecular cell* **64**: 688–703.
- Stingle J, Bellelli R, Boulton SJ. 2017.** Mechanisms of DNA-protein crosslink repair. *Nature reviews. Molecular cell biology* **18**: 563–573.
- Stingle J, Habermann B, Jentsch S. 2015.** DNA-protein crosslink repair: proteases as DNA repair enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* **40**: 67–71.
- Stingle J, Schwarz MS, Bloemeke N, Wolf PG, Jentsch S. 2014.** A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair. *Cell* **158**: 327–338.
- Strumberg D, Pilon AA, Smith M, Hickey R, Malkas L, Pommier Y. 2000.** Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Molecular and cellular biology* **20**: 3977–3987.
- Sugawara N, Wang X, Haber JE. 2003.** In Vivo Roles of Rad52, Rad54, and Rad55 Proteins in Rad51-Mediated Recombination. *Molecular cell* **12**: 209–219.
- Swenberg JA, Lu K, Moeller BC, Gao L, Upton PB, Nakamura J, Starr TB. 2011.** Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **120 Suppl 1**: S130-45.
- Symington LS, Gautier J. 2011.** Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual review of genetics* **45**: 247–271.

- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. 1983.** The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25–35.
- Tago Y, Imai M, Ihara M, Atofujii H, Nagata Y, Yamamoto K. 2005.** *Escherichia coli* mutator (Delta)polA is defective in base mismatch correction: the nature of in vivo DNA replication errors. *Journal of molecular biology* **351**: 299–308.
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S. 1998.** Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal* **17**: 5497–5508.
- Taylor ER, McGowan CH. 2008.** Cleavage mechanism of human Mus81-Eme1 acting on Holliday-junction structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 3757–3762.
- Trowbridge K, McKim K, Brill SJ, Sekelsky J. 2007.** Synthetic lethality of *Drosophila* in the absence of the MUS81 endonuclease and the DmBlm helicase is associated with elevated apoptosis. *Genetics* **176**: 1993–2001.
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. 2006.** Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**: 811–816.
- Tuteja N, Ahmad P, Panda BB, Tuteja R. 2009.** Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutation research* **681**: 134–149.
- Uchiyama Y, Hatanaka M, Kimura S, Ishibashi T, Ueda T, Sakakibara Y, Matsumoto T, Furukawa T, Hashimoto J, Sakaguchi K. 2002.** Characterization of DNA polymerase δ from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.). *Gene* **295**: 19–26.
- Uchiyama Y, Kimura S, Yamamoto T, Ishibashi T, Sakaguchi K. 2004.** Plant DNA polymerase lambda, a DNA repair enzyme that functions in plant meristematic and meiotic tissues. *European journal of biochemistry* **271**: 2799–2807.
- van Kregten M, Pater S de, Romeijn R, van Schendel R, Hooykaas PJJ, Tijsterman M. 2016.** T-DNA integration in plants results from polymerase- θ -mediated DNA repair. *Nature plants* **2**: 16164.
- Vance JR, Wilson TE. 2002.** Yeast Tdp1 and Rad1-Rad10 function as redundant pathways for repairing Top1 replicative damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 13669–13674.
- Vaz B, Popovic M, Newman JA, Fielden J, Aitkenhead H, Halder S, Singh AN, Vendrell I, Fischer R, Torrecilla I et al. 2016.** Metalloprotease SPRTN/DVC1 Orchestrates Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair. *Molecular cell* **64**: 704–719.
- Vaz B, Popovic M, Ramadan K. 2017.** DNA-Protein Crosslink Proteolysis Repair. *Trends in Biochemical Sciences* **42**: 483–495.
- Vesela E, Chroma K, Turi Z, Mistrik M. 2017.** Common Chemical Inductors of Replication Stress: Focus on Cell-Based Studies. *Biomolecules* **7**.

- Vilotti S, Biagioli M, Foti R, Dal Ferro M, Lavina ZS, Collavin L, Del Sal G, Zucchelli S, Gustincich S. 2012.** The PML nuclear bodies-associated protein TTRAP regulates ribosome biogenesis in nucleolar cavities upon proteasome inhibition. *Cell death and differentiation* **19**: 488–500.
- Vindigni A, Hickson ID. 2009.** RecQ helicases: multiple structures for multiple functions? *HFSP journal* **3**: 153–164.
- Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA. 1966.** Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata* 1,2. *Journal of the American Chemical Society* **88**: 3888–3890.
- Wallis JW, Chrebet G, Brodsky G, Rolfe M, Rothstein R. 1989.** A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**: 409–419.
- Wang B, Alam SL, Meyer HH, Payne M, Stemmler TL, Davis DR, Sundquist WI. 2003.** Structure and ubiquitin interactions of the conserved zinc finger domain of Npl4. *The Journal of biological chemistry* **278**: 20225–20234.
- Wang JC. 1996.** DNA topoisomerases. *Annual review of biochemistry* **65**: 635–692.
- Wang Z, Song Y, Li S, Kurian S, Xiang R, Chiba T, Wu X. 2019.** DNA polymerase θ (POLQ) is important for repair of DNA double-strand breaks caused by fork collapse. *The Journal of biological chemistry* **294**: 3909–3919.
- Wasserman RA, Wang JC. 1994.** Analysis of yeast DNA topoisomerase II mutants resistant to the antitumor drug amsacrine. *Cancer research* **54**: 1795–1800.
- Waterworth WM, Drury GE, Bray CM, West CE. 2011.** Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *The New phytologist* **192**: 805–822.
- Welsh KM, Lu AL, Clark S, Modrich P. 1987.** Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutH gene product. *The Journal of biological chemistry* **262**: 15624–15629.
- West CE, Waterworth WM, Sunderland PA, Bray CM. 2004.** Arabidopsis DNA double-strand break repair pathways. *Biochemical Society transactions* **32**: 964–966.
- Wolter F, Klemm J, Puchta H. 2018.** Efficient in planta gene targeting in Arabidopsis using egg cell-specific expression of the Cas9 nuclease of *Staphylococcus aureus*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **94**: 735–746.
- Wu L, Hickson ID. 2003.** The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**: 870–874.
- Wu W-Q, Hou X-M, Li M, Dou S-X, Xi X-G. 2015.** BLM unfolds G-quadruplexes in different structural environments through different mechanisms. *Nucleic acids research* **43**: 4614–4626.
- Wyatt DW, Feng W, Conlin MP, Yousefzadeh MJ, Roberts SA, Mieczkowski P, Wood RD, Gupta GP, Ramsden DA. 2016.** Essential Roles for Polymerase θ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks. *Molecular cell* **63**: 662–673.

- Xu D, Guo R, Sobeck A, Bachrati CZ, Yang J, Enomoto T, Brown GW, Hoatlin ME, Hickson ID, Wang W. 2008.** RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability. *Genes & development* **22**: 2843–2855.
- Yang SW, Burgin AB, Huizenga BN, Robertson CA, Yao KC, Nash HA. 1996.** A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 11534–11539.
- Yip MCJ, Bodnar NO, Rapoport TA. 2020.** Ddi1 is a ubiquitin-dependent protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**: 7776–7781.
- Yu AM, McVey M. 2010.** Synthesis-dependent microhomology-mediated end joining accounts for multiple types of repair junctions. *Nucleic acids research* **38**: 5706–5717.
- Zagnoli-Vieira G, Bruni F, Thompson K, He L, Walker S, Brouwer APM de, Taylor RW, Niyazov D, Caldecott KW. 2018.** Confirming TDP2 mutation in spinocerebellar ataxia autosomal recessive 23 (SCAR23). *Neurology. Genetics* **4**: e262.
- Zagnoli-Vieira G, Caldecott KW. 2017.** TDP2, TOP2, and SUMO: what is ZATT about? *Cell research* **27**: 1405–1406.
- Zeng Z, Cortés-Ledesma F, El Khamisy SF, Caldecott KW. 2011.** TDP2/TTRAP is the major 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase activity in vertebrate cells and is critical for cellular resistance to topoisomerase II-induced DNA damage. *The Journal of biological chemistry* **286**: 403–409.
- Zeng Z, Sharma A, Ju L, Murai J, Umans L, Vermeire L, Pommier Y, Takeda S, Huylebroeck D, Caldecott KW et al. 2012.** TDP2 promotes repair of topoisomerase I-mediated DNA damage in the absence of TDP1. *Nucleic acids research* **40**: 8371–8380.
- Zhu Z, Chung W-H, Shim EY, Lee SE, Ira G. 2008.** Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134**: 981–994.

8. ANHANG

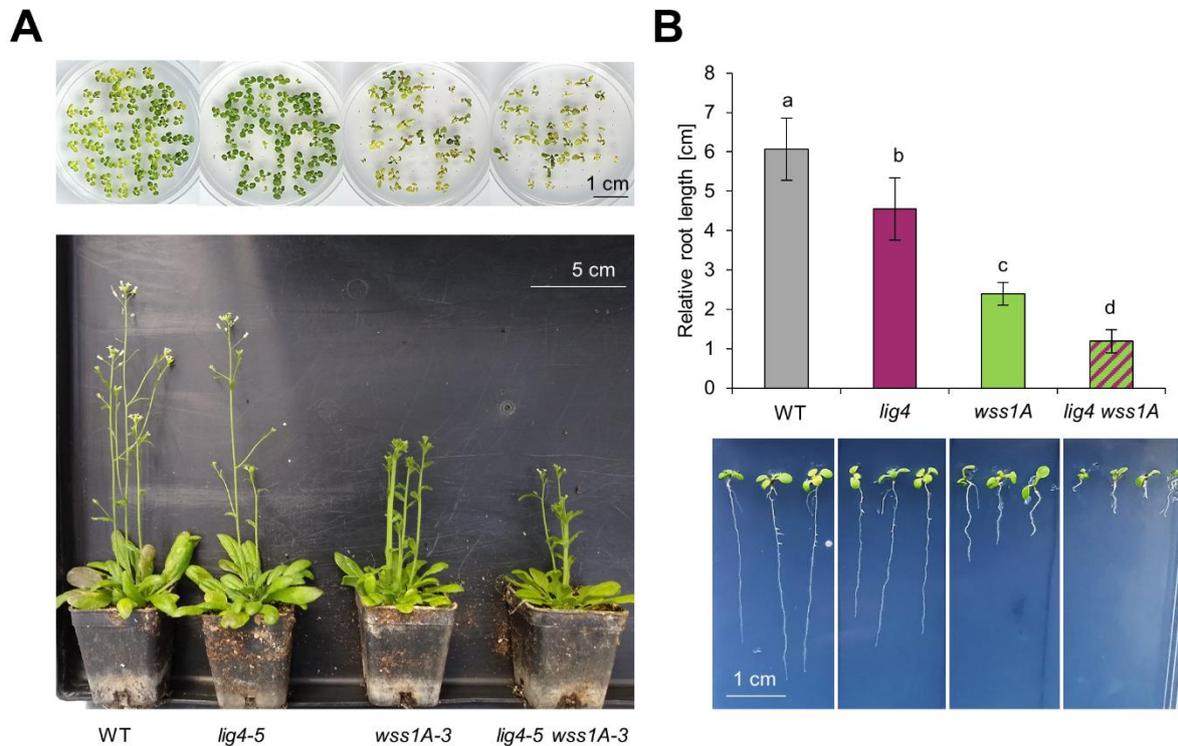


Abbildung 8.1: Phänotypisierung der *lig4 wss1A* Doppelmutante.

A) Dargestellt ist der Wuchstyp der *lig4 wss1A* Doppelmutante im Vergleich zu den beiden Einzelmutanten und dem Wildtyp (WT). Die *lig4 wss1A* Doppelmutante wies nach zwei Wochen axenischer Anzucht, sowie nach vier Wochen Anzucht in Erde den gleichen Wuchstyp wie die *wss1A* Mutante auf. B) Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Wurzellänge der verschiedenen Genotypen nach neun Tagen aufrechter axenischer Anzucht ($n=3$, $N=10$), mit je drei bis vier exemplarischen Wurzeln pro Genotyp. Die *lig4* und die *wss1A* Einzelmutanten wiesen bereits signifikant kürzere Wurzeln auf, wobei die Wurzellängen der *wss1A* Mutanten nochmals signifikant kürzer als die der *lig4* Mutanten waren. Die Doppelmutante zeigte einen synergistischen Effekt und wies im Vergleich zu beiden Einzelmutanten eine signifikant reduzierte Wurzellänge auf. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Statistische Signifikanzen wurden mit dem zweiseitigen T-Test mit ungleicher Varianz ermittelt: $a \neq b$, wenn $p < 0,05$. n = Anzahl der biologischen Replikate, N = Anzahl der Proben pro biologisches Replikat. Die Rohdaten der Wurzellängenanalyse sind Tabelle 8.25.

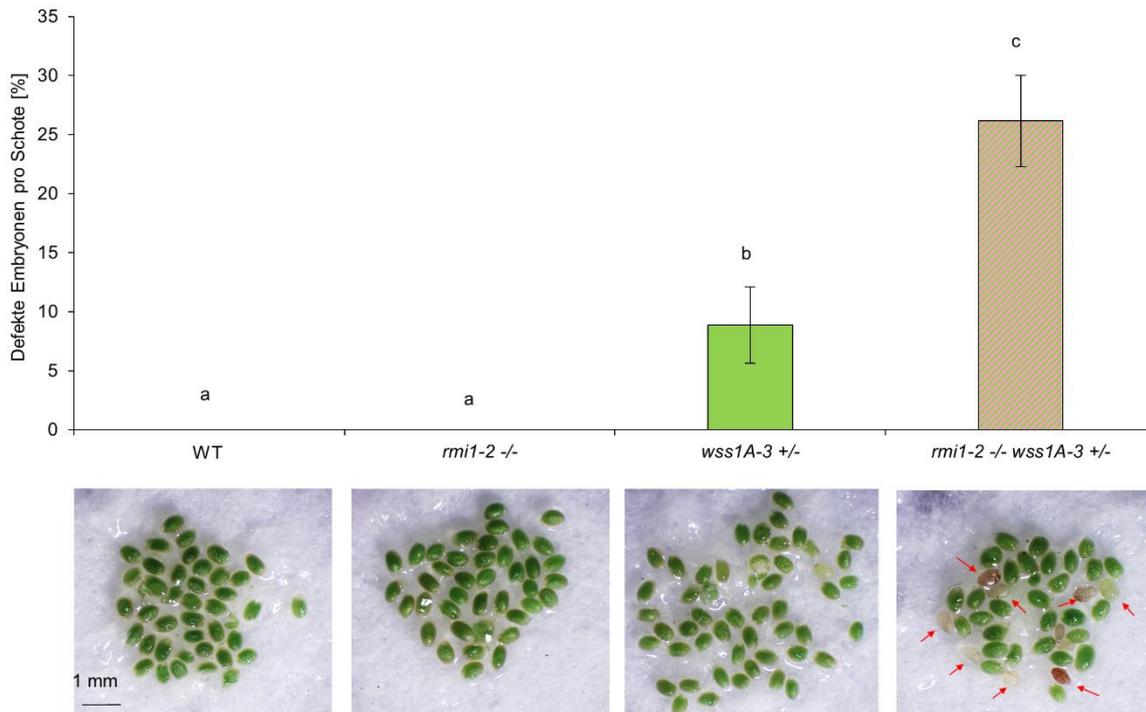


Abbildung 8.2: Embryonenanalyse der heterozygoten *rmi1 wss1A* Doppelmutante.

Dargestellt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils an defekten Samen von je fünf großen, unreifen Schoten jedes Genotyps. Samen mit vitalen Embryonen sind grün, während weiße und bräunliche Samen auf unentwickelte, oder fehlerhafte entwickelte Embryonen hinweisen. Der Wildtyp (WT) und die *rmi1* Mutante wiesen keine defekten Embryonen in ihren Schoten auf. Die heterozygote *wss1A* Mutante zeigte hingegen eine signifikant erhöhte Anzahl von defekten Embryonen. Bei der heterozygoten Doppelmutante waren ein Viertel aller Embryonen in den Schoten defekt. Statistische Unterschiede wurden mit einem zweiseitigen exakten Test von Fisher berechnet: $a \neq b$ wenn $p < 0,05$. Die Rohdaten der Analyse können Tabelle 8.26 entnommen werden.

Tabelle 8.1: Primersequenzen zur Genotypisierung

Aufgelistet sind die Namen und die Sequenzen der Primer, die für die Genotypisierung von Mutantenlinien verwendet wurden.

Primer Name	Sequenz (5' - 3')
<i>LBa1</i>	TGGTTCACGTAGTGGCCATCG
<i>LBb1.3</i>	ATTTTGCCGATTTCCGAA
<i>LBd1</i>	TCGGAACCACAATCAAACAG
<i>lig4-3 fw</i>	GTTGGCGATACTAGCGTCATC
<i>lig4-3 rev</i>	GCACAATTCCTTCATCTCTG
<i>MUS81-1</i>	AGTGAATCTGATAGTGAGTG
<i>MUS?-R2</i>	GCAGCATCAATAAGCTCTTG
<i>RECQ4A fw</i>	GTCCCTGATCGTGTGGACAG
<i>RECQ4A rev</i>	AATAAGAGACACAAGTGGAGA
<i>RM11-IN2-FW</i>	TTCACCATAGCCGAGTTA
<i>RM11-IN2-REV</i>	AGAAGCTCATACTAGACTG
<i>TDP1-14 FW3</i>	GACACTTGTCTTCCTCAGG
<i>TDP2 Screen fw</i>	CTGCTTGGCTCCTGTATCTC
<i>TDP2 screen rev 1</i>	CGCTTTCACCAATTCGACTTG
<i>TDP2 screen rev 2</i>	GCCTCTCGAAACTGCCACATC
<i>tdp2-5 Mut fw5</i>	GTAACGACGCTGACCGTC
<i>tdp2-5 WT fw</i>	GAGTAACGACGCTGATTCCTC

Fortsetzung Tabelle 8.1: Primersequenzen zur Genotypisierung

Primer Name	Sequenz (5'-3')
<i>teb-5 LP</i>	ATTCATTGCTCGGCATCTATG
<i>teb-5 RP</i>	CGATTCATTGGATTGTTTTGG
<i>WSS1A FW2</i>	GGCTTAGGAGGGTAAACCATGA
<i>WSS1A RV1</i>	GCTATCACCAAGACGTTG
<i>WSS1A RV2</i>	CTGCTATCACCAAGACG
<i>WSS1A-52 FW5</i>	GAGGCGTGCAAGTGAATTC

Tabelle 8.2: Primerkombinationen für Genotypisierungen und Amplifikationen.

Aufgelistet sind die jeweiligen Primerkombinationen für die Genotypisierung der in dieser Arbeit verwendeten Mutantenlinien, mit Angabe der Annealingtemperatur und der Elongationszeit der Dream-Taq Polymerase. Die einzelnen Sequenzen für die Primer sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Genotyp	Screening	Primer Kombination	Anneal.-Temp.	Elongationszeit
<i>tdp2-1</i>	WT	tdp2-5 WT fw / TDP2 Screen rev2	60 °C	1 min
	Mutante	tdp2-5 Mut fw5 / TDP2 Screen rev2	60 °C	1 min
<i>tdp2-2</i>	Amplifikation	TDP2 Screen fw / TDP2 screen rev 1	60 °C	1 min
<i>tdp2-3</i>	Amplifikation	TDP2 Screen fw / TDP2 screen rev 1	60 °C	1 min
<i>tdp1-4</i>	WT	TDP1 FW3 / TDP1 RV2	56 °C	1 min
	Mutante	TDP1 -14 FW3 / TDP1 RV2	56 °C	1 min
<i>mus81-1</i>	WT	MUS81-1 / MUS?-R2	56 °C	1 min
	T-DNA	MUS?-R2 / LB1	56 °C	1 min
<i>recq4A-4</i>	WT	RECQ4A fw / RECQ4A rev	56 °C	1 min
	T-DNA	LB1 / RECQ4A rev	56 °C	1 min
<i>rmi1-2</i>	WT	RMI1-IN2-FW / RMI1-IN2-REV	56 °C	1 min
	T-DNA	RMI1-IN2-FW / LBd1	56 °C	1 min
<i>wss1A-3</i>	WT	WSS1A FW2 / WSS1A RV1	56 °C	1 min
	Mutante	WSS1A-52 FW5 / WSS1A RV2	56 °C	1 min
<i>lig4-5</i>	WT	lig4-3 fw / lig4-3 rev	56 °C	1 min
	T-DNA	lig4-3 fw / LBa1	56 °C	1 min
<i>teb-5</i>	WT DNA	teb-5 RP / teb-5 LP	56 °C	1 min
	T-DNA	teb-5 RP / LBb1.3	53 °C	1 min

Tabelle 8.3: Oligonukleotide für die CRISPR-Klonierung.

Die Tabelle listet die Oligonukleotide auf, die für die CRISPR-Klonierung für die *TDP2* Mutagenese verwendet wurden. Aufgelistet ist jeweils der Name der Zielsequenz (*Protospacer*), die Position des *protospacer adjacent motifs* (PAM) vor der Zielsequenz und die Oligonukleotidsequenzen in 5'-3'-Richtung, die für die Klonierung verwendet wurden.

Protospacer	Position protospacer adjacent motif (PAM) ausgehend vom Startcodon	Spacer-Sequenz (5'-3') für Klonierung
PS1	5'-tcGGGT-3' an Position 340	Fw: attgTAACGACGCTGATTCCTCCG Rev: aaacCGGAGGAATCAGCGTCGTTA
PS2	5'-atGGGT-3' an Position 1455	Fw: attgAAGTTTCCTTTGCCAGACAA Rev: aaacTTGTCTGGCAAAGGAACTT
PS3	5'-agGGGT-3' an Position 710	Fw: attgTGTCATTGTTTGGTTTTTGT Rev: aaacACAAAAACCAACAATGACA
PS4	5'-ACCCtt-3' an Position 1726	Fw: attgGTTTGATCTCATTTTGGCGA Rev: aaacTCGCCAAATGAGATCAAC

Tabelle 8.4: Verwendete Primer Kombinationen für die Etablierung von Cas9-generierten *tdp2*-Mutanten.

Aufgelistet sind die Primerkombinationen und deren Sequenzen in 5'-3'-Richtung, zugeordnet nach deren Verwendung, die für die Etablierung von *tdp2*-Mutantenlinien verwendet wurden.

Verwendung	Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3')
HRM	TDP2 PS1+PS3 HRM fw	CGTCTTCTCTCTGGGATTTTCAGG
	TDP2 PS1 HRM rev	CGACCTCGACGACGTCATCATC
Transgen-Screening	PPT Cas9 Screening fw	AGCGGATAACAATTTACACACAGG
	Sau Cas9-1 rev	CTTCTCTTAGCAAGGTGGAGC
Amplifikation	TDP2 PS1+PS3 Screen fw	CTGCTTGGCTCCTGTATCTC
	TDP2 screen rev 1	CGCTTTCCACCAATTCGACTTG
cDNA Qualitätskontrolle	Aktin2-Q-fw	TCCGGCGACTTGACAGA
	Aktin2-Q-rev	GACATACATAGCGGGAG
Amplifikation cDNA	TDP2 PS1+PS3 Screen fw	CTGCTTGGCTCCTGTATCTC
	TDP2 screen rev 1	CGCTTTCCACCAATTCGACTTG

Tabelle 8.5: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von *tdp2*-Mutanten

Dargestellt sind die Wurzellängen der zwei *tdp2*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Angegeben ist die jeweilige Wurzellänge aus drei verschiedenen Versuchsansätzen in cm, die daraus errechneten Mittelwerte, die Mittelwerte der relativen Wurzellängen, sowie die p-Werte die mittels des zweiseitigen T-Tests mit ungleicher Varianz ermittelt wurden. Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.3 B dargestellt.

Wurzellänge von <i>tdp2</i> Mutanten [cm]			
	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>tdp2-2</i>
Versuchsansatz 1			
Wurzel 1	10,04	7,72	7,66
Wurzel 2	10,49	8,31	9,05
Wurzel 3	10,21	6,07	8,70
Wurzel 4	10,09	6,62	9,45
Wurzel 5	10,99	9,94	9,89
Wurzel 6	10,86	9,09	7,51
Wurzel 7	7,85	10,72	9,78
Wurzel 8	9,03	7,77	8,60
Wurzel 9	7,57	5,91	9,01
Wurzel 10	9,57	9,58	8,40
Versuchsansatz 2			
Wurzel 1	7,69	7,27	7,96
Wurzel 2	8,23	7,58	6,84
Wurzel 3	7,51	7,27	6,11
Wurzel 4	6,98	7,45	6,55
Wurzel 5	7,28	8,64	7,21
Wurzel 6	9,47	8,03	6,30
Wurzel 7	8,26	6,44	7,20
Wurzel 8	8,79	7,18	7,67
Wurzel 9	8,69	7,20	8,68
Wurzel 10	8,88	7,57	8,39
Versuchsansatz 3			
Wurzel 1	7,57	8,86	9,90
Wurzel 2	8,26	8,18	10,83
Wurzel 3	6,73	10,52	7,99
Wurzel 4	6,51	9,67	9,18
Wurzel 5	11,29	8,75	9,32
Wurzel 6	6,61	10,14	10,37
Wurzel 7	9,29	9,78	10,01
Wurzel 8	8,52	9,11	8,83
Wurzel 9	6,18	10,14	8,39
Wurzel 10	9,87	9,82	10,49
Mittelwert			
Versuchsansatz 1	9,67	8,17	8,80
Versuchsansatz 2	8,18	7,46	7,29
Versuchsansatz 3	8,08	9,50	9,53
Mittelwert [%]			
Versuchsansatz 1	100	84,51	91,04
Versuchsansatz 2	100	91,25	89,17
Versuchsansatz 3	100	117,51	117,91
Gesamt			
Mittelwert [%]	100	97,76	99,38
Standardabw.	0	17,44	16,08
T-Test			
WT zu <i>tdp2-1</i>	0,84		
WT zu <i>tdp2-2</i>	0,95		
<i>tdp2-1</i> zu <i>tdp2-2</i>	0,91		

Tabelle 8.6: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von *tdp2*-Mutanten.

Dargestellt ist die Anzahl toter Zellen der zwei *tdp2*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT), vor und nach der Behandlung mit 20 μ M Eto. Angegeben ist die jeweilige Anzahl toter Zellen aus drei verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte und die Standardabweichung, die Werte der zweifaktoriellen ANOVA, die für die Berechnung der statistischen Signifikanzen mit dem Tukey's Post-Hoc verwendet wurden, sowie die spezifischen Signifikanz Werte zwischen den verglichenen Genotypen (Die Begrifflichkeiten können in Tabelle 8.28 eingesehen werden). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.4 dargestellt.

Anzahl toter Zellen pro Wurzel						
	unbehandelt			behandelt mit 20 μ M Eto		
	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>tdp2-2</i>	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>tdp2-2</i>
Versuchsansatz 1						
Wurzel 1	0	0	0	0	2	2
Wurzel 2	0	3	0	0	8	6
Wurzel 3	0	0	0	0	8	4
Wurzel 4	0	0	0	0	5	0
Wurzel 5	5	0	0	1	6	2
Wurzel 6	0	0	0	1	1	1
Wurzel 7	0	0	0	0	2	1
Wurzel 8	0	0	0	0	7	1
Wurzel 9	0	0	0	0	6	6
Wurzel 10	0	0	0	0	8	4
Versuchsansatz 2						
Wurzel 1	0	0	0	6	5	5
Wurzel 2	0	0	0	0	3	4
Wurzel 3	0	0	0	0	7	4
Wurzel 4	1	0	0	0	5	5
Wurzel 5	0	0	0	1	2	3
Wurzel 6	0	0	0	0	3	4
Wurzel 7	0	0	0	0	0	2
Wurzel 8	0	0	0	0	5	7
Wurzel 9	0	0	0	0	9	7
Wurzel 10	0	1	2	0	5	6
Versuchsansatz 3						
Wurzel 1	0	0	0	0	1	8
Wurzel 2	0	0	0	0	1	4
Wurzel 3	0	0	0	0	4	2
Wurzel 4	0	0	2	0	4	6
Wurzel 5	0	0	0	0	2	4
Wurzel 6	0	0	0	0	3	1
Wurzel 7	0	1	0	1	4	0
Wurzel 8	0	0	0	0	4	2
Wurzel 9	0	0	1	0	4	5
Wurzel 10	0	1	0	0	4	6
Mittelwert						
Versuchsansatz 1	0,5	0,3	0	0,2	5,3	2,7
Versuchsansatz 2	0,1	0,1	0,2	0,7	4,4	4,7
Versuchsansatz 3	0,0	0,2	0,3	0,1	3,1	3,8
Gesamt						
Mittelwert [%]	0,20	0,20	0,17	0,30	4,27	3,73
Standardabw.	0,27	0,10	0,15	0,32	1,11	1,00
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung	k=3; n.obs=3; df=16; MS=0,406; q-Wert = 3,204; errechneter kritischer Wert (für p=0,05) = 1,178					
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen						
WT zu <i>tdp2-1</i>	0,000			3,933		
WT zu <i>tdp2-2</i>	0,033			3,400		
<i>tdp2-1</i> zu <i>tdp2-2</i>	0,033			0,533		
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung	k=2; n.obs=3; df=16; MS=0,406; q-Wert = 2,919; errechneter kritischer Wert (für p=0,05) = 1,073					
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Eto-Sensitivität						
WT zu WT Eto	0,133					
<i>tdp2-1</i> zu <i>tdp2-1</i> Eto	4,067					
<i>tdp2-2</i> zu <i>tdp2-2</i> Eto	3,567					

Tabelle 8.7: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von DPC Reparaturmutanten

Dargestellt ist die Anzahl toter Zellen der verschiedenen DPC-Reparaturmutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT), vor und nach der Behandlung mit 20 μ M Eto. Angegeben ist die jeweilige Anzahl toter Zellen aus drei verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte und die Standardabweichung, die Werte der zweifaktoriellen ANOVA, die für die Berechnung der statistischen Signifikanzen mit dem Tukey's Post-Hoc verwendet wurden, sowie die spezifischen Signifikanz Werte zwischen den verglichenen Genotypen (Begrifflichkeiten s. Tabelle 8.27). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.5 dargestellt.

	Anzahl toter Zellen pro Wurzel									
	unbehandelt					behandelt mit 20 μ M Eto				
	WT	<i>mus81-1</i>	<i>tdp1-4</i>	<i>tdp2-1</i>	<i>wss1A-3</i>	WT	<i>mus81-1</i>	<i>tdp1-4</i>	<i>tdp2-1</i>	<i>wss1A-3</i>
Versuchsansatz 1										
Wurzel 1	0	1	0	0	10	0	6	0	0	11
Wurzel 2	0	3	0	0	8	0	7	0	2	10
Wurzel 3	0	4	0	0	5	0	11	0	2	16
Wurzel 4	0	5	0	0	8	0	3	0	4	8
Wurzel 5	0	3	0	0	5	0	7	0	2	4
Wurzel 6	0	2	0	0	9	2	5	2	5	6
Wurzel 7	0	4	0	0	10	0	7	0	3	10
Wurzel 8	0	3	0	0	3	0	9	1	0	11
Wurzel 9	0	4	1	0	7	0	6	0	2	5
Wurzel 10	0	3	0	0	7	0	3	0	4	12
Versuchsansatz 2										
Wurzel 1	0	6	0	0	9	2	1	1	6	8
Wurzel 2	0	3	0	0	9	1	5	0	4	6
Wurzel 3	0	0	0	0	10	0	4	0	6	3
Wurzel 4	0	2	0	0	8	1	4	0	0	9
Wurzel 5	0	1	0	0	9	0	6	1	1	12
Wurzel 6	2	3	0	0	2	0	7	0	0	13
Wurzel 7	0	6	0	0	6	1	4	1	4	7
Wurzel 8	0	2	0	0	7	0	1	0	4	8
Wurzel 9	0	1	0	0	5	0	3	0	9	7
Wurzel 10	0	3	0	0	4	0	4	0	0	8
Versuchsansatz 3										
Wurzel 1	0	0	0	0	5	3	1	0	2	9
Wurzel 2	0	5	0	0	5	0	7	0	1	11
Wurzel 3	0	4	0	1	7	0	2	0	3	14
Wurzel 4	0	5	0	0	5	0	3	0	2	12
Wurzel 5	0	1	0	0	4	0	3	1	6	8
Wurzel 6	0	5	0	0	7	0	2	2	5	11
Wurzel 7	0	1	0	0	9	0	5	1	1	9
Wurzel 8	0	6	0	0	6	0	5	2	6	12
Wurzel 9	0	3	0	0	6	0	8	0	7	7
Wurzel 10	0	3	0	0	6	0	7	0	0	11
Mittelwert										
Versuchsansatz 1	0,0	3,2	0,1	0,0	7,2	0,2	6,4	0,3	2,4	9,3
Versuchsansatz 2	0,2	2,7	0,0	0,0	6,9	0,5	3,9	0,3	3,4	8,1
Versuchsansatz 3	0,0	3,3	0,0	0,1	6	0,3	4,3	0,6	3,3	10,4
Gesamt										
Mittelwert [%]	0,07	3,07	0,03	0,03	6,70	0,33	4,87	0,40	3,03	9,27
Standardabw.	0,12	0,32	0,06	0,06	0,62	0,15	1,34	0,17	0,55	1,15
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung	k=5; n.obs=3; df=16; MS=0,464; q-Wert = 3,736; errechneter kritischer Wert (für p=0,05) = 1,469									
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen										
WT zu <i>tdp2</i>	0,100					3,400				
WT zu <i>mus81</i>	2,981					4,533				
WT zu <i>tdp1</i>	0,033					0,067				
WT zu <i>wss1A</i>	6,633					8,911				
<i>tdp2</i> zu <i>mus81</i>	2,881					1,133				
<i>tdp2</i> zu <i>tdp1</i>	0,133					3,333				
<i>tdp2</i> zu <i>wss1A</i>	6,533					5,511				
<i>mus81</i> zu <i>tdp1</i>	3,014					4,467				
<i>mus81</i> zu <i>wss1A</i>	6,533					4,378				
<i>tdp1</i> zu <i>wss1A</i>	6,667					8,844				

Fortsetzung von Tabelle 8.7: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von DPC Reparaturmutanten.

Anzahl toter Zellen pro Wurzel	
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung	k=2; n.obs=3; df=16; MS=0,464; q-Wert = 2,439; errechneter kritischer Wert (für p=0,05) = 0,959
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Eto-Sensitivität	
WT zu WT Eto	0,267
<i>mus81</i> zu <i>mus81</i> Eto	3,567
<i>Tdp1</i> zu <i>tdp1</i> Eto	1,819
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2</i> -Eto	0,367
<i>wss1A</i> zu <i>wss1A</i> Eto	2,544

Tabelle 8.8: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von *tdp1 tdp2*-Mutanten.

Dargestellt sind die Wurzellängen von *tdp1 tdp2*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Angegeben ist die jeweilige Wurzellänge aus drei verschiedenen Versuchsansätzen in cm, die daraus errechneten Mittelwerte, die Mittelwerte der relativen Wurzellängen, sowie die p-Werte die mittels des zweiseitigen T-Tests mit ungleicher Varianz ermittelt wurden. Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.6 B dargestellt.

Wurzellänge von <i>tdp1 tdp2</i> Mutanten [cm]				
	WT	<i>tdp1-4</i>	<i>tdp2-1</i>	<i>tdp1-4 tdp2-2</i>
Versuchsansatz 1				
Wurzel 1	8,03	12,65	8,89	7,87
Wurzel 2	10,31	14,56	8,88	8,92
Wurzel 3	10,46	10,99	9,13	6,90
Wurzel 4	8,96	12,40	7,51	11,27
Wurzel 5	10,31	12,84	7,79	8,61
Wurzel 6	8,55	9,91	8,59	9,39
Wurzel 7	9,54	11,66	8,67	10,54
Wurzel 8	9,50	10,21	8,94	9,20
Wurzel 9	9,86	10,33	7,53	8,70
Wurzel 10	10,15	12,49	7,95	9,98
Versuchsansatz 2				
Wurzel 1	8,68	12,13	10,50	9,01
Wurzel 2	8,91	11,70	10,37	7,66
Wurzel 3	8,23	11,81	10,41	8,56
Wurzel 4	8,64	10,18	12,13	8,65
Wurzel 5	7,59	9,47	10,78	9,08
Wurzel 6	8,62	11,07	8,96	7,91
Wurzel 7	7,93	10,39	11,23	7,91
Wurzel 8	8,51	7,63	9,70	6,66
Wurzel 9	7,56	10,39	10,73	8,91
Wurzel 10	8,51	10,01	9,76	4,78
Versuchsansatz 3				
Wurzel 1	9,71	10,34	9,86	12,41
Wurzel 2	12,36	10,95	11,07	12,52
Wurzel 3	10,95	8,06	9,27	12,41
Wurzel 4	11,38	9,78	9,54	12,88
Wurzel 5	6,04	10,31	10,37	12,43
Wurzel 6	9,65	8,89	10,07	10,43
Wurzel 7	8,71	10,58	10,36	12,67
Wurzel 8	11,09	9,92	9,46	10,07
Wurzel 9	11,38	2,76	9,14	12,02
Wurzel 10	11,35	11,36	10,70	12,29
Mittelwert				
Versuchsansatz 1	9,57	11,80	8,39	9,14
Versuchsansatz 2	8,32	10,48	10,46	7,91
Versuchsansatz 3	10,26	9,29	9,99	12,01
Mittelwert [%]				
Versuchsansatz 1	100	123,38	87,67	95,50
Versuchsansatz 2	100	125,98	125,72	95,16
Versuchsansatz 3	100	90,56	97,28	117,05
Gesamt				
Mittelwert [%]	100	113,30	103,56	102,57
Standardabw.	0	19,74	19,79	12,54
T-Test [p-Wert]				
WT zu <i>tdp1</i>	0,363			
WT zu <i>tdp2</i>	0,785			
WT zu <i>tdp1 tdp2</i>	0,757			
<i>tdp1</i> zu <i>tdp2</i>	0,578			
<i>tdp1</i> zu <i>tdp1 tdp2</i>	0,478			
<i>tdp2</i> zu <i>tdp1 tdp2</i>	0,946			

Tabelle 8.9: Rohdaten der CPT-Sensitivitätsanalyse von *tdp1 tdp2*-Mutanten

Dargestellt ist das relative Frischgewicht von *tdp1 tdp2*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT) bei verschiedenen CPT Konzentrationen. Angegeben ist das relative Frischgewicht aus drei verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte, die spezifischen Werte der einfaktoriellen ANOVA, sowie die mit dem Tukey's Post-Hoc errechneten Signifikanzniveaus (Begrifflichkeiten s. Tabelle 8.28). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.7 dargestellt.

Relatives Frischgewicht [%]				
	150 nM	300 nM	600 nM	1200 nM
Versuchsansatz 1				
WT	79,61	59,23	57,10	35,60
<i>tdp1-4</i>	83,99	83,77	63,42	69,88
<i>tdp2-1</i>	92,98	87,62	75,75	52,58
<i>tdp1-4 tdp2-3</i>	75,34	71,90	53,30	40,18
Versuchsansatz 2				
WT	84,09	77,75	67,90	49,49
<i>tdp1-4</i>	75,99	72,22	67,79	51,10
<i>tdp2-1</i>	82,36	76,74	63,87	52,58
<i>tdp1-4 tdp2-3</i>	86,93	65,75	57,29	41,19
Versuchsansatz 3				
WT	88,37	78,51	68,66	40,59
<i>tdp1-4</i>	95,20	75,47	67,41	55,00
<i>tdp2-1</i>	95,75	84,75	74,91	42,01
<i>tdp1-4 tdp2-3</i>	83,54	68,39	61,33	36,45
Gesamt				
Mittelwert [%]				
WT	84,02	71,83	64,56	41,89
<i>tdp1-4</i>	85,06	77,15	66,21	58,66
<i>tdp2-1</i>	90,36	83,04	71,45	45,66
<i>tdp1-4 tdp2-3</i>	81,94	68,68	57,31	39,27
Standardabw.				
WT	4,38	10,92	6,46	7,03
<i>tdp1-4</i>	9,65	5,95	2,42	9,91
<i>tdp2-1</i>	7,07	5,64	6,57	5,99
<i>tdp1-4 tdp2-3</i>	5,96	3,08	5,68	2,59
Einfaktorielle ANOVA $n_1=3; n_2=3; df=4; q$ (für $p < 0,05$) =4,041				
Spezifische Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA				
	MS=49,42	MS=49,02	MS=26,74	MS=47,48
	SE=4,059	SE=4,042	SE=2,985	SE=3,978
Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen (qs)				
WT zu <i>tdp1</i>	1,562	8,319	2,310	0,946
WT zu <i>tdp2</i>	0,255	3,950	0,553	4,214
WT zu <i>tdp1 tdp2</i>	0,513	2,340	2,427	0,659
<i>tdp1</i> zu <i>tdp2</i>	1,307	4,369	1,757	3,268
<i>tdp1</i> zu <i>tdp1 tdp2</i>	1,307	4,369	4,737	3,268
<i>tdp2</i> zu <i>tdp1 tdp2</i>	2,076	6,289	2,980	4,873

Tabelle 8.10: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von *tdp1 tdp2* Mutanten.

Dargestellt ist die Anzahl toter Zellen der *tdp1* und *tdp2* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT), vor und nach der Behandlung mit 20 μ M Eto. Angegeben ist die jeweilige Anzahl toter Zellen aus drei verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte und die Standardabweichung, die Werte der zweifaktoriellen ANOVA, die für die Berechnung der statistischen Signifikanzen mit dem Tukey's Post-Hoc verwendet wurden, sowie die spezifischen Signifikanz Werte zwischen den verglichenen Genotypen (Begrifflichkeiten s. Tabelle 8.28). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.8 dargestellt.

	Anzahl toter Zellen pro Wurzel							
	unbehandelt				behandelt mit 20 μ M Eto			
	WT	<i>tdp1-4</i>	<i>tdp2-1</i>	<i>tdp1-4 tdp2-2</i>	WT	<i>tdp1-4</i>	<i>tdp2-1</i>	<i>tdp1-4 tdp2-1</i>
Versuchsansatz 1								
Wurzel 1	0	0	0	0	0	0	9	1
Wurzel 2	0	0	0	0	0	1	1	1
Wurzel 3	0	0	0	0	1	0	5	1
Wurzel 4	0	0	0	0	0	0	2	8
Wurzel 5	0	0	0	0	0	1	3	4
Wurzel 6	0	0	0	0	0	0	4	0
Wurzel 7	0	0	0	0	0	0	1	1
Wurzel 8	0	0	0	0	0	0	5	3
Wurzel 9	0	0	0	0	0	0	1	2
Wurzel 10	0	0	0	0	0	0	8	7

Fortsetzung Tabelle 8.10: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von *tdp1 tdp2* Mutanten.

	Anzahl toter Zellen pro Wurzel							
	unbehandelt				behandelt mit 20 µM Eto			
	WT	<i>tdp1-4</i>	<i>tdp2-1</i>	<i>tdp1-4 tdp2-2</i>	WT	<i>tdp1-4</i>	<i>tdp2-1</i>	<i>tdp1-4 tdp2-1</i>
Versuchsansatz 2								
Wurzel 1	0	1	0	0	1	0	3	0
Wurzel 2	0	0	0	0	0	0	6	1
Wurzel 3	0	1	0	0	0	0	2	3
Wurzel 4	0	0	0	0	0	0	2	1
Wurzel 5	0	0	0	0	0	0	3	1
Wurzel 6	1	1	0	0	0	2	3	3
Wurzel 7	0	0	0	0	0	0	2	4
Wurzel 8	0	0	0	0	0	0	2	1
Wurzel 9	0	0	0	0	0	0	6	6
Wurzel 10	0	0	0	1	1	0	0	9
Versuchsansatz 3								
Wurzel 1	0	1	0	0	0	1	4	2
Wurzel 2	0	0	0	0	0	0	8	0
Wurzel 3	0	0	0	0	0	0	11	2
Wurzel 4	0	1	0	0	0	1	0	5
Wurzel 5	0	0	0	0	0	0	9	3
Wurzel 6	0	1	0	0	1	0	0	7
Wurzel 7	0	0	0	0	0	0	5	4
Wurzel 8	0	0	0	0	0	0	5	3
Wurzel 9	0	0	0	0	0	0	0	10
Wurzel 10	0	0	0	0	0	0	3	4
Mittelwert								
Versuchsansatz 1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,1	0,2	3,9	2,8
Versuchsansatz 2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	2,9	2,9
Versuchsansatz 3	0,0	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	4,5	4,0
Gesamt								
Mittelwert [%]	0,03	0,20	0,20	0,17	0,13	0,20	3,77	3,23
Standardabw.	0,27	0,15	0,10	0,15	0,06	0,00	0,81	0,67
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung, Tukey Post-Hoc	k=4; n.obs=3; df=16; MS=0,142; q-Wert = 4,046; errechneter kritischer Wert (für p<0,05) = 0,881							
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen								
WT zu <i>tdp1</i>	0,167				0,067			
WT zu <i>tdp2</i>	0,033				3,633			
WT zu <i>tdp1 tdp2</i>	0,000				3,100			
<i>tdp1</i> zu <i>tdp2</i>	0,200				3,567			
<i>tdp1</i> zu <i>tdp1 tdp2</i>	0,167				3,033			
<i>tdp2</i> zu <i>tdp1 tdp2</i>	0,033				0,533			
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung, Tukey Post-Hoc für Eto-Sensitivität	k=2; n.obs=3; df=16; MS=0,142; q-Wert = 2,998; errechneter kritischer Wert für (p<0,05) = 0,652							
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Eto-Sensitivität								
WT zu WT Eto	0,100							
<i>tdp1</i> zu <i>tdp1</i> Eto	0,000							
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2</i> Eto	3,767							
<i>tdp1 tdp2</i> zu <i>tdp1 tdp2</i> Eto	3,200							

Tabelle 8.11: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von *tdp2 mus81*-Mutanten.

Dargestellt sind die Wurzellängen von *tdp2 mus81*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Angegeben ist die jeweilige Wurzellänge aus drei verschiedenen Versuchsansätzen in cm, die daraus errechneten Mittelwerte, die Mittelwerte der relativen Wurzellängen, sowie die p-Werte die mittels des zweiseitigen T-Tests mit ungleicher Varianz ermittelt wurden. Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.9 B dargestellt.

Wurzellänge von <i>tdp2 mus81</i> Mutanten [cm]				
	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>tdp2-1 mus81-1</i>
Versuchsansatz 1				
Wurzel 1	9,74	8,78	7,12	5,43
Wurzel 2	7,76	8,04	6,02	4,14
Wurzel 3	9,42	5,41	5,90	5,75
Wurzel 4	9,17	8,77	5,24	6,44
Wurzel 5	9,34	8,60	6,10	4,49
Wurzel 6	8,10	10,15	5,88	5,43
Wurzel 7	6,48	9,32	4,01	4,27
Wurzel 8	8,91	9,33	6,30	6,83
Wurzel 9	8,39	9,31	3,43	5,46
Wurzel 10	8,43	9,38	4,36	5,67
Versuchsansatz 2				
Wurzel 1	6,46	7,00	5,19	4,59
Wurzel 2	8,46	8,33	3,46	4,75
Wurzel 3	8,24	6,75	5,68	3,42
Wurzel 4	6,39	7,00	5,06	7,06
Wurzel 5	7,87	4,76	4,90	4,74
Wurzel 6	6,70	7,73	5,60	6,21
Wurzel 7	8,96	7,56	6,14	3,68
Wurzel 8	7,37	5,96	4,90	4,79
Wurzel 9	7,90	5,22	6,04	4,77
Wurzel 10	7,91	7,36	5,56	3,63
Versuchsansatz 3				
Wurzel 1	10,09	8,36	4,38	5,47
Wurzel 2	8,47	8,38	5,90	5,22
Wurzel 3	9,22	8,38	5,74	6,90
Wurzel 4	8,99	8,35	5,20	4,75
Wurzel 5	7,56	7,33	6,26	5,86
Wurzel 6	8,91	6,94	4,91	6,65
Wurzel 7	8,74	7,75	5,40	5,96
Wurzel 8	7,28	9,01	4,89	6,18
Wurzel 9	7,17	7,40	6,04	3,75
Wurzel 10	7,11	7,55	4,38	5,70
Mittelwert				
Versuchsansatz 1	8,57	8,71	5,43	5,39
Versuchsansatz 2	7,63	6,77	5,25	4,76
Versuchsansatz 3	8,36	7,94	5,31	5,64
Mittelwert [%]				
Versuchsansatz 1	100	101,55	63,39	62,88
Versuchsansatz 2	100	88,76	68,91	62,47
Versuchsansatz 3	100	95,08	63,54	67,54
Gesamt				
Mittelwert [%]	100	95,13	65,28	64,30
Standardabw.	0	6,40	3,15	2,82
T-Test [p-Wert]				
WT zu <i>tdp2</i>	0,318			
WT zu <i>mus81</i>	0,003			
WT zu <i>tdp2 mus81</i>	0,002			
<i>tdp2</i> zu <i>mus81</i>	0,006			
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2 mus81</i>	0,006			
<i>mus81</i> zu <i>tdp2 mus81</i>	0,709			

Tabelle 8.12: Rohdaten der CPT-Sensitivitätsanalyse von *tdp2 mus81*-Mutanten.

Dargestellt ist das relative Frischgewicht von *tdp2* und *mus81*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT) bei verschiedenen CPT Konzentrationen. Angegeben ist das relative Frischgewicht aus drei verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte, die spezifischen Werte der einfaktoriellen ANOVA, sowie die mit dem Tukey's Post-Hoc errechneten Signifikanzniveaus (Begrifflichkeiten s. Tabelle 8.28). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.10 dargestellt.

Relatives Frischgewicht [%]	150 nM	300 nM	600 nM	1200 nM
Versuchsansatz 1				
WT	64,94	67,24	42,63	31,85
<i>tdp2-1</i>	74,10	66,29	48,01	29,40
<i>mus81-1</i>	36,25	20,20	18,64	17,47
<i>tdp2-1 mus81-1</i>	37,55	27,18	29,05	21,33
Versuchsansatz 2				
WT	82,39	58,18	66,36	51,06
<i>tdp2-1</i>	94,43	66,56	68,47	51,70
<i>mus81-1</i>	39,41	35,93	25,22	19,51
<i>tdp2-1 mus81-1</i>	51,58	39,21	28,78	25,92
Versuchsansatz 3				
WT	84,34	69,57	57,31	43,59
<i>tdp2-1</i>	74,00	60,67	53,02	40,53
<i>mus81-1</i>	28,94	23,82	20,74	17,95
<i>tdp2-1 mus81-1</i>	43,30	25,96	23,76	18,53
Gesamt				
Mittelwert [%]				
WT	77,22	65,00	55,43	42,17
<i>tdp2-1</i>	80,84	64,51	56,50	40,54
<i>mus81-1</i>	34,86	26,65	21,53	18,31
<i>tdp2-1 mus81-1</i>	44,14	30,78	27,20	21,93
Standardabw.				
WT	10,68	6,02	11,98	9,69
<i>tdp2-1</i>	11,77	3,33	10,67	11,15
<i>mus81-1</i>	5,37	8,24	3,36	1,07
<i>tdp2-1 mus81-1</i>	7,05	7,32	2,98	3,37
Einfaktorielle ANOVA	$n_1=3; n_2=3; df=4; q \text{ (für } p < 0,05) = 4,041$			
Spezifische Werte der einfaktoriellen ANOVA	MS=82,77 SE=5,25	MS=42,20 SE=3,75	MS=69,35 SE=4,81	MS=58,30 SE=4,408
Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen (qs)				
WT zu <i>tdp2</i>	0,689	0,130	0,222	0,369
WT zu <i>mus81</i>	8,064	10,225	7,051	5,412
WT zu <i>tdp2 mus81</i>	6,298	9,123	5,873	4,591
<i>tdp2</i> zu <i>mus81</i>	8,753	10,095	7,273	5,043
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2 mus81</i>	6,987	8,993	6,095	4,222
<i>mus81</i> zu <i>tdp2 mus81</i>	1,767	1,102	1,178	0,821

Tabelle 8.13: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von *tdp2 mus81* Mutanten.

Dargestellt ist die Anzahl toter Zellen der *tdp2* und *mus81* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT), vor und nach der Behandlung mit 20 μ M Eto. Angegeben ist die jeweilige Anzahl toter Zellen aus drei verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte und die Standardabweichung, die Werte der zweifaktoriellen ANOVA, die für die Berechnung der statistischen Signifikanzen mit dem Tukey's Post-Hoc verwendet wurden, sowie die spezifischen Signifikanz Werte zwischen den verglichenen Genotypen (Begrifflichkeiten s. Tabelle 8.27). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.11 dargestellt.

	Anzahl toter Zellen pro Wurzel							
	unbehandelt				behandelt mit 20 μ M Eto			
	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1 tdp2-1</i>	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>mus81-1</i>	<i>mus81-1 tdp2-1</i>
Versuchsansatz 1								
Wurzel 1	0	0	2	7	0	7	3	8
Wurzel 2	0	0	3	3	0	5	0	5
Wurzel 3	0	0	6	6	1	8	0	8
Wurzel 4	0	0	7	2	0	7	6	9
Wurzel 5	0	0	6	3	0	9	10	10
Wurzel 6	0	0	7	7	0	8	13	9
Wurzel 7	0	0	2	5	2	7	7	9
Wurzel 8	0	0	0	2	0	4	0	9
Wurzel 9	0	0	8	0	0	9	3	11
Wurzel 10	0	0	0	6	0	5	5	8
Versuchsansatz 2								
Wurzel 1	0	1	2	2	1	8	8	5
Wurzel 2	0	0	2	0	0	5	8	8
Wurzel 3	0	0	2	2	0	6	5	7
Wurzel 4	0	0	4	2	0	2	1	10
Wurzel 5	2	0	4	2	0	5	1	10
Wurzel 6	0	0	4	3	0	7	5	7
Wurzel 7	0	0	1	3	0	5	3	7
Wurzel 8	0	0	2	0	0	3	3	10
Wurzel 9	0	0	3	3	0	2	8	10
Wurzel 10	0	0	2	3	0	2	4	9
Versuchsansatz 3								
Wurzel 1	0	0	4	3	1	2	8	5
Wurzel 2	0	0	4	5	1	8	6	10
Wurzel 3	0	0	3	5	0	9	6	9
Wurzel 4	0	0	3	7	2	8	0	9
Wurzel 5	0	0	2	3	0	3	4	13
Wurzel 6	2	0	4	6	1	7	8	7
Wurzel 7	0	0	5	6	0	6	8	8
Wurzel 8	0	0	2	3	0	2	9	13
Wurzel 9	0	0	3	6	0	9	10	12
Wurzel 10	0	0	5	0	0	6	5	11
Mittelwert								
Versuchsansatz 1	0,3	0,0	4,5	6,1	0,3	6,9	4,7	8,6
Versuchsansatz 2	0,2	0,0	3,5	4,4	0,1	4,5	4,6	8,3
Versuchsansatz 3	0,0	0,0	4,1	4,1	0,5	6	6,4	9,7
Gesamt								
Mittelwert [%]	0,17	0,00	4,03	4,87	0,30	5,80	5,23	8,87
Standardabw.	0,15	0,00	0,50	1,08	0,20	1,21	1,01	0,74
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung	k=4; n.obs=3; df=16; MS= 0,565; q-Wert = 4,046; errechneter kritischer Wert (für p=0,05) = 1,755							
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen (Differenz)								
WT zu <i>tdp2</i>	0,167				5,500			
WT zu <i>mus81</i>	3,867				4,933			
WT zu <i>tdp2 mus81</i>	4,700				8,567			
<i>tdp2</i> zu <i>mus81</i>	4,033				0,567			
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2 mus81</i>	4,867				3,067			
<i>mus81</i> zu <i>tdp2 mus81</i>	0,833				3,633			
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung	k=2; n.obs=3; df=16; MS= 0,565; q-Wert = 2,998; errechneter kritischer Wert (für p=0,05) = 1,301							
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Eto-Sensitivität (Differenz)								
WT zu WT Eto	0,133							
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2</i> Eto	5,800							
<i>mus81</i> zu <i>mus81</i> Eto	1,200							
<i>tdp2 mus81</i> zu <i>tdp2 mus81</i> Eto	4,000							

Tabelle 8.14: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von *tdp2 wss1A*-Mutanten.

Dargestellt sind die Wurzellängen von *tdp2 wss1A*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Angegeben ist die jeweilige Wurzellänge aus vier verschiedenen Versuchsansätzen in cm, die daraus errechneten Mittelwerte, die Mittelwerte der relativen Wurzellängen, sowie die p-Werte die mittels des zweiseitigen T-Tests mit ungleicher Varianz ermittelt wurden. Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.12 B dargestellt.

Wurzellänge von <i>tdp2 wss1A</i> Mutanten [cm]				
	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>wss1A-3</i>	<i>tdp2-1 wss1A-3</i>
Versuchsansatz 1				
Wurzel 1	8,03	8,89	1,93	2,38
Wurzel 2	10,31	8,88	4,96	3,83
Wurzel 3	10,46	9,13	1,67	0,51
Wurzel 4	8,96	7,51	4,81	0,74
Wurzel 5	10,31	7,79	4,58	1,22
Wurzel 6	8,55	8,59	3,82	3,00
Wurzel 7	9,54	8,67	1,64	3,74
Wurzel 8	9,50	8,94	1,17	2,45
Wurzel 9	9,86	7,53	2,43	2,93
Wurzel 10	10,15	7,95	3,26	3,87
Versuchsansatz 2				
Wurzel 1	8,68	10,50	3,26	1,37
Wurzel 2	8,91	10,37	3,36	1,00
Wurzel 3	8,23	10,41	2,78	2,18
Wurzel 4	8,64	12,13	3,20	2,45
Wurzel 5	7,59	10,78	3,10	0,32
Wurzel 6	8,62	8,96	1,57	2,06
Wurzel 7	7,93	11,23	2,43	1,04
Wurzel 8	8,51	9,70	1,31	2,65
Wurzel 9	7,56	10,73	3,69	2,59
Wurzel 10	8,51	9,76	3,33	2,40
Versuchsansatz 3				
Wurzel 1	9,71	9,86	6,03	2,19
Wurzel 2	12,36	11,07	5,21	1,51
Wurzel 3	10,95	9,27	3,03	1,83
Wurzel 4	11,38	9,54	5,14	2,37
Wurzel 5	6,04	10,37	5,29	2,52
Wurzel 6	9,65	10,07	4,91	3,90
Wurzel 7	8,71	10,36	3,01	1,09
Wurzel 8	11,09	9,46	6,69	3,87
Wurzel 9	11,38	9,14	1,85	3,23
Wurzel 10	11,35	10,70	3,62	1,71
Versuchsansatz 4				
Wurzel 1	8,54	11,33	4,48	0,75
Wurzel 2	8,00	11,50	2,56	2,58
Wurzel 3	7,54	9,35	4,14	0,47
Wurzel 4	7,84	10,90	1,06	3,13
Wurzel 5	7,58	10,05	4,22	1,77
Wurzel 6	10,11	9,21	3,77	2,39
Wurzel 7	7,57	10,92	2,65	1,32
Wurzel 8	9,86	10,32	4,22	3,54
Wurzel 9	8,74	10,67	5,12	3,97
Wurzel 10	8,92	9,49	2,16	1,37
Mittelwert				
Versuchsansatz 1	9,57	8,39	3,03	2,47
Versuchsansatz 2	8,32	10,46	2,80	1,81
Versuchsansatz 3	10,26	9,99	4,48	2,42
Versuchsansatz 4	8,47	10,37	3,44	2,13
Mittelwert [%]				
Versuchsansatz 1	100	87,67	31,62	25,77
Versuchsansatz 2	100	125,72	33,68	21,71
Versuchsansatz 3	100	97,28	43,61	23,60
Versuchsansatz 4	100	122,47	40,60	25,12
Gesamt				
Mittelwert [%]	100	108,29	37,38	24,05
Standardabw.	0	18,72	5,66	2,15
T-Test [p-Wert]				
WT zu <i>tdp2</i>	0,441			
WT zu <i>mus81</i>	<0,001			
WT zu <i>tdp2 mus81</i>	<0,001			
<i>tdp2</i> zu <i>mus81</i>	0,003			
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2 mus81</i>	0,003			
<i>mus81</i> zu <i>tdp2 mus81</i>	0,014			

Tabelle 8.15: Rohdaten der CPT-Sensitivitätsanalyse von *tdp2 wss1A*-Mutanten.

Dargestellt ist das relative Frischgewicht von *tdp2* und *wss1A*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT) bei verschiedenen CPT Konzentrationen. Angegeben ist das relative Frischgewicht aus drei verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte, die spezifischen Werte der einfaktoriellen ANOVA, sowie die mit dem Tukey's Post-Hoc errechneten Signifikanzniveaus (Begrifflichkeiten s. Tabelle 8.28). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.13 dargestellt.

Relatives Frischgewicht [%]				
	150 nM	300 nM	600 nM	1200 nM
Versuchsansatz 1				
WT	79,61	59,23	57,10	35,60
<i>tdp2-1</i>	92,98	87,62	75,57	42,39
<i>wss1A-3</i>	98,59	50,31	38,69	18,09
<i>tdp2-1 wss1A-3</i>	135,08	72,35	21,65	16,73
Versuchsansatz 2				
WT	84,09	77,75	67,90	49,49
<i>tdp2-1</i>	82,36	76,74	63,87	52,58
<i>wss1A-3</i>	96,45	65,30	51,97	20,43
<i>tdp2-1 wss1A-3</i>	81,80	51,99	33,33	26,74
Versuchsansatz 3				
WT	88,37	78,51	68,66	40,59
<i>tdp2-1</i>	95,75	84,75	74,91	42,01
<i>wss1A-3</i>	75,02	68,32	41,31	28,52
<i>tdp2-1 wss1A-3</i>	107,02	66,69	53,72	21,02
Gesamt				
Mittelwert [%]				
WT	84,02	71,83	64,56	41,89
<i>tdp2-1</i>	90,36	83,04	71,45	45,66
<i>wss1A-3</i>	90,02	61,31	43,99	22,68
<i>tdp2-1 wss1A-3</i>	107,97	63,68	36,23	21,50
Standardabw.				
WT	4,38	10,92	6,46	7,03
<i>tdp2-1</i>	7,07	5,64	6,57	5,99
<i>wss1A-3</i>	13,03	9,64	7,03	6,04
<i>tdp2-1 wss1A-3</i>	26,65	10,51	16,23	5,02
Einfaktorielle ANOVA				
	$n_1=3; n_2=3; df=4; q$ (für $p < 0,05$) =4,041			
Spezifische Werte der einfaktoriellen ANOVA				
	MS=237,31 SE=8,89	MS=88,62 SE=5,44	MS=99,46 SE=5,76	MS=36,77 SE=3,50
Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen (qs)				
WT zu <i>tdp2</i>	0,713	2,062	1,198	1,076
WT zu <i>wss1A</i>	0,674	1,936	3,571	5,489
WT zu <i>tdp2 wss1A</i>	2,692	1,500	4,918	5,826
<i>tdp2</i> zu <i>wss1A</i>	0,039	3,998	4,769	6,564
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2 wss1A</i>	1,979	3,562	6,116	6,901
<i>wss1A</i> zu <i>tdp2 wss1A</i>	2,018	0,436	1,347	0,337

Tabelle 8.16: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von *tdp2 wss1A* Mutanten.

Dargestellt ist die Anzahl toter Zellen der *tdp2* und *wss1A* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT), vor und nach der Behandlung mit 20 μ M Eto. Angegeben ist die jeweilige Anzahl toter Zellen aus vier verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte, die Standardabweichung, die Werte der zweifaktoriellen ANOVA, die für die Berechnung der statistischen Signifikanzen mit dem Tukey's Post-Hoc verwendet wurden, sowie die spezifischen Signifikanz Werte zwischen den verglichenen Genotypen (Begrifflichkeiten s. Tabelle 8.27). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.14 dargestellt.

	Anzahl toter Zellen pro Wurzel							
	unbehandelt				behandelt mit 20 μ M Eto			
	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>wss1A-3</i>	<i>tdp2-1 wss1A-3</i>	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>wss1A-3</i>	<i>tdp2-1 wss1A-3</i>
Versuchsansatz 1								
Wurzel 1	0	0	9	4	0	0	13	16
Wurzel 2	0	0	6	14	0	1	17	12
Wurzel 3	0	0	5	7	0	8	15	15
Wurzel 4	0	0	5	6	0	1	7	11
Wurzel 5	0	0	3	10	0	4	7	19
Wurzel 6	0	0	7	8	0	0	12	9
Wurzel 7	0	0	6	9	1	3	12	11
Wurzel 8	0	0	3	5	0	4	5	14
Wurzel 9	0	0	10	12	0	2	11	11
Wurzel 10	1	0	6	9	0	3	7	13

Fortsetzung Tabelle 8.16: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von *tdp2 wss1A* Mutanten

Anzahl toter Zellen pro Wurzel								
	unbehandelt				behandelt mit 20 µM Eto			
	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>wss1A-3</i>	<i>tdp2-1 wss1A-3</i>	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>wss1A-3</i>	<i>tdp2-1 wss1A-3</i>
Versuchsansatz 2								
Wurzel 1	0	0	7	7	1	0	8	17
Wurzel 2	0	0	6	14	0	1	15	14
Wurzel 3	0	0	9	5	2	11	7	12
Wurzel 4	0	2	6	8	0	1	5	14
Wurzel 5	0	0	3	13	0	0	17	17
Wurzel 6	0	0	5	15	0	4	15	15
Wurzel 7	0	0	10	6	0	1	13	21
Wurzel 8	0	0	13	8	0	5	3	22
Wurzel 9	0	0	12	14	1	2	13	11
Wurzel 10	0	0	8	5	0	1	11	23
Versuchsansatz 3								
Wurzel 1	0	0	5	9	0	1	13	11
Wurzel 2	0	0	12	13	1	8	15	18
Wurzel 3	0	1	5	5	0	3	10	18
Wurzel 4	0	0	11	6	1	11	7	14
Wurzel 5	0	0	4	2	0	1	13	11
Wurzel 6	1	0	7	15	0	2	13	14
Wurzel 7	0	0	9	3	2	8	9	9
Wurzel 8	0	0	9	11	0	7	7	12
Wurzel 9	0	1	10	8	0	5	10	12
Wurzel 10	0	0	3	6	0	8	11	15
Versuchsansatz 4								
Wurzel 1	0	0	8	4	0	2	12	19
Wurzel 2	1	0	9	13	0	0	10	13
Wurzel 3	0	0	8	6	0	0	12	16
Wurzel 4	0	0	8	7	0	4	7	15
Wurzel 5	0	0	13	9	0	1	13	16
Wurzel 6	0	0	5	14	0	3	12	17
Wurzel 7	0	0	10	4	0	5	9	14
Wurzel 8	0	1	3	16	0	2	10	15
Wurzel 9	0	0	9	15	1	3	13	13
Wurzel 10	0	0	9	10	0	0	10	14
Mittelwert								
Versuchsansatz 1	0,1	0,0	6,0	8,4	0,1	2,6	10,6	13,1
Versuchsansatz 2	0,0	0,2	7,9	9,5	0,4	2,6	10,7	16,6
Versuchsansatz 3	0,1	0,2	7,5	7,8	0,4	5,4	10,8	13,4
Versuchsansatz 4	0,0	0,1	8,2	9,8	0,2	2,0	10,8	15,2
Gesamt								
Mittelwert [%]	0,05	0,13	7,40	8,88	0,28	3,15	10,73	14,58
Standardabw.	0,06	0,10	0,98	0,94	0,17	1,62	0,10	1,94
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen	k=4; n.obs=4; df=24; MS= 0,861; q-Wert = 3,901; errechneter kritischer Wert (für p<0,05) = 1,755							
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen								
WT zu <i>tdp2</i>	0,075				2,875			
WT zu <i>wss1A</i>	7,350				10,450			
WT zu <i>tdp2 wss1A</i>	8,825				14,300			
<i>tdp2</i> zu <i>wss1A</i>	7,275				7,575			
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2 wss1A</i>	8,750				11,425			
<i>wss1A</i> zu <i>tdp2 wss1A</i>	1,475				3,850			
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen	k=2; n.obs=4; df=24; MS= 0,861; q-Wert = 2,919; errechneter kritischer Wert (für p<0,05) = 1,354							
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Eto-Sensitivität								
WT zu WT Eto	0,225							
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2</i> Eto	3,025							
<i>wss1A</i> zu <i>wss1A</i> Eto	3,325							
<i>tdp2 wss1A</i> zu <i>tdp2 wss1A</i> Eto	5,700							

Tabelle 8.17: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von *tdp2 lig4* Mutanten.

Dargestellt ist die Anzahl toter Zellen der *tdp2* und *lig4* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT), vor und nach der Behandlung mit 20 μ M Eto. Angegeben ist die jeweilige Anzahl toter Zellen aus vier verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte, die Standardabweichung, die Werte der zweifaktoriellen ANOVA, die für die Berechnung der statistischen Signifikanzen mit dem Tukey's Post-Hoc verwendet wurden, sowie die spezifischen Signifikanz Werte zwischen den verglichenen Genotypen (Begrifflichkeiten s. Tabelle 8.27). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.15 dargestellt.

	Anzahl toter Zellen pro Wurzel							
	unbehandelt				behandelt mit 20 μ M Eto			
	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>lig4-5</i>	<i>tdp2-1 lig4-5</i>	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>lig4-5</i>	<i>tdp2-1 lig4-5</i>
Versuchsansatz 1								
Wurzel 1	0	0	2	0	0	3	9	6
Wurzel 2	0	0	0	0	0	3	7	4
Wurzel 3	0	0	0	0	1	1	12	7
Wurzel 4	0	0	0	0	0	3	6	4
Wurzel 5	0	0	0	0	0	2	13	4
Wurzel 6	0	0	0	0	0	5	9	6
Wurzel 7	2	0	0	0	1	2	10	6
Wurzel 8	0	0	0	0	0	1	7	7
Wurzel 9	0	4	2	1	0	2	8	3
Wurzel 10	0	0	1	0	1	6	10	4
Versuchsansatz 2								
Wurzel 1	0	1	1	0	1	3	10	5
Wurzel 2	0	0	1	0	0	4	9	5
Wurzel 3	0	0	2	1	0	1	7	6
Wurzel 4	0	0	0	0	0	6	6	5
Wurzel 5	0	0	2	0	0	7	11	4
Wurzel 6	0	0	0	0	0	2	8	9
Wurzel 7	0	0	0	0	0	3	7	4
Wurzel 8	0	0	0	0	0	2	12	6
Wurzel 9	0	0	0	0	0	4	13	6
Wurzel 10	0	0	3	0	0	2	8	7
Versuchsansatz 3								
Wurzel 1	0	0	0	0	0	3	6	5
Wurzel 2	0	0	0	0	1	3	9	6
Wurzel 3	0	0	0	0	0	4	7	6
Wurzel 4	0	0	0	1	0	3	13	9
Wurzel 5	0	0	0	0	0	2	12	3
Wurzel 6	0	0	2	4	1	6	11	8
Wurzel 7	0	0	4	0	0	3	12	5
Wurzel 8	0	1	0	1	0	4	8	6
Wurzel 9	0	0	3	0	0	1	6	5
Wurzel 10	0	0	0	0	0	4	12	3
Mittelwert								
Versuchsansatz 1	0,2	0,4	0,5	0,1	0,3	2,8	9,1	5,1
Versuchsansatz 2	0,0	0,1	0,9	0,1	0,2	3,4	9,1	5,7
Versuchsansatz 3	0,0	0,1	0,9	0,6	0,1	3,3	9,6	5,6,
Gesamt								
Mittelwert [%]	0,07	0,20	0,77	0,27	0,20	3,17	9,27	5,47
Standardabw.	0,12	0,17	0,23	0,29	0,10	0,32	0,29	0,32
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen	k=4; n.obs=3; df=16; MS= 0,06; q-Wert = 4,046; errechneter kritischer Wert (für p=0,05) = 0,572							
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen								
WT zu <i>tdp2</i>	0,133				2,967			
WT zu <i>lig4</i>	0,700				9,067			
WT zu <i>tdp2 lig4</i>	0,200				5,267			
<i>tdp2</i> zu <i>lig4</i>	0,567				6,100			
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2 lig4</i>	0,067				2,300			
<i>lig4</i> zu <i>tdp2 lig4</i>	0,500				3,800			
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen	k=2; n.obs=3; MS=0,06, q-Wert=2,998; Errechneter kritischer Wert (für p<0,05) =0,424							
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Eto-Sensitivität								
WT zu WT Eto	0,133							
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2</i> Eto	2,967							
<i>lig4</i> zu <i>lig4</i> Eto	8,500							
<i>tdp2 lig4</i> zu <i>tdp2 lig4</i> Eto	5,200							

Tabelle 8.18: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von *tdp2 teb* Mutanten.

Dargestellt ist die Anzahl toter Zellen der *tdp2* und *teb* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT), vor und nach der Behandlung mit 20 μ M Eto. Angegeben ist die jeweilige Anzahl toter Zellen aus vier verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte, die Standardabweichung, die Werte der zweifaktoriellen ANOVA, die für die Berechnung der statistischen Signifikanzen mit dem Tukey's Post-Hoc verwendet wurden, sowie die spezifischen Signifikanz Werte zwischen den verglichenen Genotypen (Begrifflichkeiten s. Tabelle 8.27). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.16 dargestellt.

	Anzahl toter Zellen pro Wurzel							
	unbehandelt				behandelt mit 20 μ M Eto			
	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>teb-5</i>	<i>tdp2-1 teb-5</i>	WT	<i>tdp2-1</i>	<i>teb-5</i>	<i>tdp2-1 teb-5</i>
Versuchsansatz 1								
Wurzel 1	0	0	11	13	0	3	19	14
Wurzel 2	0	0	10	9	0	9	20	15
Wurzel 3	0	0	4	2	0	3	14	21
Wurzel 4	0	0	7	10	0	8	15	19
Wurzel 5	0	0	5	7	0	6	12	12
Wurzel 6	0	0	5	7	0	2	17	14
Wurzel 7	0	1	6	6	1	2	17	15
Wurzel 8	0	0	4	12	0	6	9	17
Wurzel 9	0	0	10	6	0	5	12	21
Wurzel 10	0	0	6	10	2	6	16	20
Versuchsansatz 2								
Wurzel 1	0	0	2	8	1	2	13	19
Wurzel 2	0	0	11	9	0	5	10	12
Wurzel 3	0	0	10	10	2	3	15	19
Wurzel 4	0	1	5	6	0	3	7	14
Wurzel 5	0	0	10	7	0	5	10	15
Wurzel 6	0	0	5	7	0	2	8	16
Wurzel 7	0	0	4	6	0	3	9	14
Wurzel 8	0	0	6	5	0	4	11	19
Wurzel 9	0	0	4	5	1	3	17	14
Wurzel 10	0	0	6	7	0	4	12	14
Versuchsansatz 3								
Wurzel 1	0	0	5	9	0	4	9	12
Wurzel 2	0	0	12	13	0	4	15	17
Wurzel 3	0	1	5	5	0	4	9	10
Wurzel 4	0	0	11	6	1	3	13	17
Wurzel 5	0	0	4	2	0	6	8	23
Wurzel 6	1	0	7	15	0	4	11	12
Wurzel 7	0	0	9	3	0	3	8	13
Wurzel 8	0	0	9	11	0	4	13	16
Wurzel 9	0	1	10	8	0	1	16	10
Wurzel 10	0	0	3	6	0	4	12	14
Versuchsansatz 4								
Wurzel 1	0	0	4	7	0	1	11	19
Wurzel 2	0	0	5	14	0	1	9	12
Wurzel 3	0	0	7	10	0	4	15	11
Wurzel 4	0	0	10	10	0	6	8	18
Wurzel 5	0	0	14	5	0	4	23	15
Wurzel 6	0	0	7	6	0	5	10	23
Wurzel 7	0	0	10	6	0	6	17	12
Wurzel 8	0	0	9	11	0	2	12	13
Wurzel 9	0	0	6	9	0	2	7	20
Wurzel 10	0	0	9	8	0	5	8	15
Mittelwert								
Versuchsansatz 1	0,0	0,1	6,8	8,2	0,3	5,0	15,1	16,8
Versuchsansatz 2	0,0	0,1	6,3	7	0,4	3,4	11,2	15,6
Versuchsansatz 3	0,1	0,0	6,7	8,5	0,1	3,7	11,4	14,4
Versuchsansatz 4	0,0	0,1	8,1	8,6	0,0	3,6	12,0	15,8
Gesamt								
Mittelwert [%]	0,03	0,08	6,98	8,08	0,20	3,93	12,43	15,65
Standardabw.	0,05	0,05	0,78	0,74	0,18	0,73	1,82	0,98
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen	k=4; n.obs=4; df=24; MS= 0,748; q-Wert = 3,901; errechneter kritischer Wert (für p<0,05) = 1,687							

Fortsetzung Tabelle 8.18: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von *tdp2 teb* Mutanten

	unbehandelt	behandelt mit 20 μ M Eto
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen		
WT zu <i>tdp2</i>	0,050	3,725
WT zu <i>teb</i>	6,950	12,225
WT zu <i>teb tdp2</i>	8,050	15,450
<i>tdp2</i> zu <i>teb</i>	6,900	8,500
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2 teb</i>	8,000	11,725
<i>teb</i> zu <i>tdp2 teb</i>	1,100	3,225
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen	k=2; n.obs=4; df=24; MS= 0,748; q-Wert = 2,919; errechneter kritischer Wert (für p<0,05) = 1,262	
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Eto-Sensitivität		
WT zu WT Eto	0,175	
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2</i> Eto	3,850	
<i>teb</i> zu <i>teb</i> Eto	5,450	
<i>tdp2 teb</i> zu <i>tdp2 teb</i> Eto	7,575	

Tabelle 8.19: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von *lig4 wss1A* Mutanten

Dargestellt ist die Anzahl toter Zellen der *lig4* und *wss1A* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT), vor und nach der Behandlung mit 20 μ M Eto. Angegeben ist die jeweilige Anzahl toter Zellen aus vier verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte, die Standardabweichung, die Werte der zweifaktoriellen ANOVA, die für die Berechnung der statistischen Signifikanzen mit dem Tukey's Post-Hoc verwendet wurden, sowie die spezifischen Signifikanz Werte zwischen den verglichenen Genotypen (Begrifflichkeiten s. Tabelle 8.27). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.17 dargestellt.

	Anzahl toter Zellen pro Wurzel							
	unbehandelt				behandelt mit 20 μ M Eto			
	WT	<i>lig4-5</i>	<i>wss1A-3</i>	<i>lig4-5 wss1A-3</i>	WT	<i>lig4-5</i>	<i>wss1A-3</i>	<i>lig4-5 wss1A-3</i>
Versuchsansatz 1								
Wurzel 1	0	0	4	5	0	9	6	10
Wurzel 2	0	3	1	6	0	6	10	16
Wurzel 3	0	3	9	3	1	13	10	16
Wurzel 4	0	1	3	5	0	8	1	13
Wurzel 5	0	0	6	8	0	9	6	10
Wurzel 6	0	0	5	4	0	10	8	12
Wurzel 7	1	1	5	2	0	10	9	16
Wurzel 8	0	0	4	3	0	6	11	15
Wurzel 9	0	0	7	5	0	14	7	12
Wurzel 10	0	0	7	8	0	11	11	14
Versuchsansatz 2								
Wurzel 1	0	2	8	7	1	8	8	10
Wurzel 2	0	1	10	5	0	9	11	11
Wurzel 3	0	0	9	10	0	8	9	12
Wurzel 4	0	0	4	8	0	11	5	11
Wurzel 5	0	0	7	7	1	10	12	13
Wurzel 6	0	3	4	7	0	7	9	12
Wurzel 7	0	0	6	10	0	10	6	11
Wurzel 8	0	0	4	8	0	8	5	14
Wurzel 9	0	1	6	9	1	6	10	14
Wurzel 10	0	0	3	4	0	7	10	9
Versuchsansatz 3								
Wurzel 1	0	0	3	8	0	6	12	7
Wurzel 2	0	0	5	5	2	8	9	10
Wurzel 3	0	4	1	9	0	12	10	13
Wurzel 4	0	2	5	2	0	8	11	12
Wurzel 5	0	1	9	5	0	9	7	13
Wurzel 6	0	1	6	7	1	11	15	10
Wurzel 7	0	3	2	8	0	8	9	12
Wurzel 8	0	0	2	4	0	9	9	8
Wurzel 9	0	0	5	5	0	9	10	15
Wurzel 10	0	0	4	5	0	11	8	11
Mittelwert								
Versuchsansatz 1	0,1	0,8	5,1	4,9	0,1	9,6	7,9	13,4
Versuchsansatz 2	0,0	0,7	6,1	7,5	0,3	8,4	8,5	11,7
Versuchsansatz 3	0,0	1,1	4,2	5,8	0,3	9,1	10	11,1

Fortsetzung Tabelle 8.19: Rohdaten der Eto-Sensitivitätsanalyse von *lig4 wss1A* Mutanten

	Anzahl toter Zellen pro Wurzel				behandelt mit 20 µM Eto			
	unbehandelt							
	WT	<i>lig4-5</i>	<i>wss1A-3</i>	<i>lig4-5 wss1A-3</i>	WT	<i>lig4-5</i>	<i>wss1A-3</i>	<i>lig4-5 wss1A-3</i>
Gesamt								
Mittelwert [%]	0,03	0,87	5,13	6,07	0,23	9,03	8,80	12,07
Standardabw.	0,06	0,21	0,95	1,32	0,12	0,60	1,08	1,19
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen	k=4; n.obs=3; df=16; MS= 0,708; q-Wert = 4,046; errechneter kritischer Wert (für p<0,05) = 1,965							
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen								
WT zu <i>lig4</i>	0,833				8,800			
WT zu <i>wss1A</i>	5,100				8,567			
WT zu <i>lig4 wss1A</i>	6,033				11,833			
<i>lig4</i> zu <i>wss1A</i>	4,267				0,233			
<i>lig4</i> zu <i>lig4 wss1A</i>	5,200				3,033			
<i>wss1A</i> zu <i>lig4 wss1A</i>	0,933				3,267			
Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen	k=2; n.obs=3; MS=0,708, q-Wert=2,998; Errechneter kritischer Wert (für p<0,05) = 1,456							
Abs. Differenz von Tukey Post-Hoc für Eto-Sensitivität								
WT zu WT Eto	0,200							
<i>tdp2</i> zu <i>tdp2</i> Eto	8,167							
<i>lig4</i> zu <i>lig4</i> Eto	3,667							
<i>tdp2 lig4</i> zu <i>tdp2 lig4</i> Eto	6,000							

Tabelle 8.20: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von *teb wss1A*-Mutanten.

Dargestellt sind die Wurzellängen von *teb wss1A*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Angegeben ist die jeweilige Wurzellänge aus drei verschiedenen Versuchsansätzen in cm, die daraus errechneten Mittelwerte, die Mittelwerte der relativen Wurzellängen, sowie die p-Werte die mittels des zweiseitigen T-Tests mit ungleicher Varianz ermittelt wurden. Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.19 A dargestellt.

Wurzellänge von <i>teb wss1A</i> Mutanten [cm]				
	WT	<i>teb-5</i>	<i>wss1A-3</i>	<i>teb-5 wss1A-3</i>
Versuchsansatz 1				
Wurzel 1	4,47	2,44	3,32	1,65
Wurzel 2	7,82	2,73	1,36	0,73
Wurzel 3	7,92	3,11	0,58	1,61
Wurzel 4	4,72	1,82	1,28	1,16
Wurzel 5	6,13	3,34	0,75	0,76
Wurzel 6	8,25	3,04	2,57	1,02
Wurzel 7	7,19	0,49	1,28	1,55
Wurzel 8	8,64	0,45	2,02	0,69
Wurzel 9	6,96	2,31	2,10	0,85
Wurzel 10	6,42	3,11	1,30	0,64
Versuchsansatz 2				
Wurzel 1	4,72	2,66	1,68	0,61
Wurzel 2	7,57	1,85	1,05	0,90
Wurzel 3	6,83	3,75	0,74	2,31
Wurzel 4	3,61	3,69	1,50	0,58
Wurzel 5	7,27	3,92	2,73	0,81
Wurzel 6	5,88	4,69	0,68	0,71
Wurzel 7	6,22	2,03	1,35	0,22
Wurzel 8	4,83	4,35	0,85	0,97
Wurzel 9	4,66	0,89	0,61	0,79
Wurzel 10	5,34	3,82	1,05	0,19
Versuchsansatz 3				
Wurzel 1	7,09	2,54	0,87	0,37
Wurzel 2	7,43	2,72	1,40	1,38
Wurzel 3	6,24	3,14	1,23	0,35
Wurzel 4	6,74	1,63	1,15	1,06
Wurzel 5	7,44	1,22	1,13	0,85
Wurzel 6	7,31	2,23	1,92	0,99
Wurzel 7	7,67	4,10	1,27	0,86
Wurzel 8	5,71	2,67	0,96	0,19
Wurzel 9	6,68	2,71	1,90	0,65
Wurzel 10	7,34	3,74	1,46	0,59

Fortsetzung Tabelle 8.20: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von *teb wssIA*-Mutanten.

	WT	<i>teb-5</i>	<i>wssIA-3</i>	<i>teb-5 wssIA-3</i>
Mittelwert				
Versuchsansatz 1	6,85	2,28	1,66	1,07
Versuchsansatz 2	5,69	3,17	1,22	0,81
Versuchsansatz 3	6,97	2,67	1,33	0,73
Mittelwert [%]				
Versuchsansatz 1	100	33,33	24,16	15,55
Versuchsansatz 2	100	55,60	21,50	14,20
Versuchsansatz 3	100	38,31	19,07	10,47
Gesamt				
Mittelwert [%]	100	42,42	21,58	13,41
Standardabw.	0	11,69	2,55	2,63
T-Test [p-Wert]				
WT zu <i>teb</i>	0,013			
WT zu <i>wssIA</i>	<0,001			
WT zu <i>teb wssIA</i>	<0,001			
<i>teb</i> zu <i>wssIA</i>	0,085			
<i>teb</i> zu <i>teb wssIA</i>	0,044			
<i>wssIA</i> zu <i>teb wssIA</i>	0,018			

Tabelle 8.21: Rohdaten der Fertilitätsanalyse von *teb wssIA*-Mutanten

Dargestellt sind die Fertilität von *teb wssIA*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Angegeben ist die jeweilige Anzahl der Samen pro Schote aus fünf verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie die p-Werte die mittels des zweiseitigen T-Tests mit ungleicher Varianz ermittelt wurden. Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.19 B dargestellt.

Fertilitätsanalyse von <i>teb wssIA</i> Mutanten				
	WT	<i>teb-5</i>	<i>wssIA-3</i>	<i>teb-5 wssIA-3</i>
Pflanze 1				
Schote 1	50	42	20	12
Schote 2	48	36	18	10
Schote 3	45	40	18	5
Schote 4	44	41	19	9
Schote 5	49	39	13	10
Pflanze 2				
Schote 1	44	45	27	15
Schote 2	42	34	11	7
Schote 3	46	36	18	9
Schote 4	45	38	23	13
Schote 5	39	42	20	9
Pflanze 3				
Schote 1	59	31	16	6
Schote 2	52	30	18	7
Schote 3	52	33	11	7
Schote 4	43	31	10	9
Schote 5	51	34	9	10
Pflanze 4				
Schote 1	44	24	19	13
Schote 2	47	35	15	8
Schote 3	48	32	14	12
Schote 4	47	22	13	13
Schote 5	46	22	11	8
Pflanze 5				
Schote 1	42	32	24	12
Schote 2	40	28	15	9
Schote 3	39	34	17	6
Schote 4	38	34	26	12
Schote 5	39	30	20	12
Mittelwert				
Pflanze 1	47,2	39,6	17,6	9,2
Pflanze 2	43,2	39	19,8	10,6
Pflanze 3	51,4	31,8	12,8	7,8
Pflanze 4	46,4	27	14,4	10,8
Pflanze 5	39,6	31,6	20,4	10,2
Gesamt				
Mittelwert	45,56	33,80	17,00	9,72
Standardabw.	4,43	5,38	3,32	1,24

Fortsetzung Tabelle 8.21: Rohdaten der Fertilitätsanalyse von *teb wssIA*-Mutanten.

T-Test [p-Wert]	
WT zu <i>teb</i>	0,006
WT zu <i>wssIA</i>	<0,001
WT zu <i>teb wssIA</i>	<0,001
<i>teb</i> zu <i>wssIA</i>	<0,001
<i>teb</i> zu <i>teb wssIA</i>	<0,001
<i>wssIA</i> zu <i>teb wssIA</i>	0,006

Tabelle 8.22: Rohdaten der Analyse somatischer Anaphasen.

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Defekten somatischen Anaphasen von *lig4*, *teb* und *wssIA* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Angegeben ist die Gesamtzahl analysierter Anaphasen pro Genotyp, der Anteil defekter Anaphasen getrennt in den jeweiligen Typ des Anaphasendefekts, sowie der relative prozentuale Anteil des jeweiligen Anaphasendefekts entsprechend des gesamten Anteils an defekten Anaphasen. Weiterhin sind die spezifischen p-Werte, welche mit dem zweiseitigen exakten Test nach Fisher berechnet wurden angegeben. Die Prozentualen Anteile der defekten somatischen Anaphasen sind als Balkendiagramm in Abbildung 3.20 dargestellt.

	WT	<i>lig4-5</i>	<i>teb-5</i>	<i>wssIA-3</i>	<i>lig4-5 wssIA-3</i>	<i>teb-5 wssIA-3</i>
Gesamtanzahl analysierter Anaphasen	250	254	224	352	271	221
Anzahl der Anaphasen mit Anaphasebrücken	2	0	2	3	2	5
Anzahl der Anaphasen mit fragmentierten Chromosomen	0	3	3	12	14	30
Gesamtanteil defekter Anaphasen [%]	0,80	1,18	2,14	4,61	5,97	15,57
Relativer Anteil von Anaphasebrücken [%]	100	0	37,40	26,04	13,41	12,84
Relativer Anteil von Chromosomen-fragmentierungen [%]	0	100	62,60	73,96	86,59	87,16
Exakter Test nach Fisher [p-Wert]						
zu <i>lig4</i>	1,000					
zu <i>teb</i>	0,260	0,480				
zu <i>wssIA</i>	0,010	0,029	0,246			
zu <i>lig4 wssIA</i>	0,001	0,004	0,046	0,350		
zu <i>teb wssIA</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Tabelle 8.23: Rohdaten der CPT-Sensitivitätsanalyse von *teb mus81*-Mutanten.

Dargestellt ist das relative Frischgewicht von *teb* und *mus81*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT) bei verschiedenen CPT Konzentrationen. Angegeben ist das relative Frischgewicht aus drei verschiedenen Versuchsansätzen, die daraus errechneten Mittelwerte, die spezifischen Werte der einfaktoriellen ANOVA, sowie die mit dem Tukey's Post-Hoc errechneten Signifikanzniveaus (Begrifflichkeiten s. Tabelle 8.28). Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.21 dargestellt.

	150 nM	300 nM
Versuchsansatz 1		
WT	81,57	64,11
<i>mus81-1</i>	32,99	21,93
<i>teb-5</i>	31,80	26,00
<i>mus81-1 teb-7</i>	39,72	27,42
Versuchsansatz 2		
WT	74,98	43,83
<i>mus81-1</i>	27,95	19,29
<i>teb-5</i>	35,57	28,66
<i>mus81-1 teb-7</i>	22,99	20,22
Versuchsansatz 3		
WT	88,37	78,51
<i>mus81-1</i>	27,29	19,44
<i>teb-5</i>	35,98	37,37
<i>mus81-1 teb-7</i>	33,18	25,99
Gesamt		
Mittelwert [%]		
WT	75,68	57,63
<i>mus81-1</i>	29,41	20,22
<i>teb-5</i>	34,45	30,68
<i>mus81-1 teb-7</i>	31,98	24,54
Standardabw.		
WT	5,57	11,96
<i>mus81-1</i>	3,12	1,48
<i>teb-5</i>	2,31	5,95
<i>mus81-1 teb-7</i>	8,43	3,81
Einfaktorielle ANOVA		
	n ₁ =3; n ₂ =3; df=4; q=4,041	
Spezifische Ergebnisse der ANOVA		
	MS=29,273; SE=3,124	MS = 69,439 SE=4,811
Tukey Post-Hoc für Unterschiede zw. Genotypen (qs)		
WT zu <i>mus81</i>	14,814	14,814
WT zu <i>teb</i>	13,201	13,201
WT zu <i>mus81 teb</i>	13,997	13,997
<i>mus81</i> zu <i>teb</i>	1,613	1,613
<i>mus81</i> zu <i>mus81 teb</i>	1,613	1,613
<i>teb</i> zu <i>mus81 teb</i>	0,816	0,816

Tabelle 8.24: Rohdaten der Embryonenanalyse von *recq4A wss1A*-Mutanten.

Dargestellt sind die Embryonenanalyse von *recq4A wss1A*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Angegeben ist die jeweilige Anzahl an defekten Embryonen pro Schote, die jeweilige Gesamtanzahl an Embryonen pro Schote, die daraus errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen und die prozentualen Anteile an defekten Embryonen pro Schote. Weiterhin sind die spezifischen p-Werte, welche mit dem zweiseitigen exakten Test nach Fisher berechnet wurden, angegeben. Die berechneten prozentualen Anteile an defekten Embryonen pro Schote sind als Säulendiagramm in Abbildung 3.22 dargestellt.

Embryonenanalyse von <i>recq4A wss1A</i>								
	WT		<i>recq4A-4 -/-</i>		<i>wss1A-3 +/-</i>		<i>recq4A-4 -/- wss1A-3 +/-</i>	
	Defekt	Gesamt	Defekt	Gesamt	Defekt	Gesamt	Defekt	Gesamt
Schote 1	2	42	0	46	5	48	9	38
Schote 2	0	45	0	44	3	49	9	38
Schote 3	0	42	0	46	3	41	13	55
Schote 4	0	47	0	47	5	49	8	54
Schote 5	0	55	0	34	2	31	14	46
Schote 6	1	52	0	24	1	51	12	42
Schote 7	0	54	0	34	3	42	10	48
Schote 8	1	45	0	48	1	40	12	50
Schote 9	0	54	1	46	4	43	13	57
Schote 10	1	42	0	58	5	53	14	43
Gesamt								
Mittelwert	0,50	47,80	0,10	42,70	3,20	44,70	11,44	47,10
Standardabw.	0,71	5,41	0,32	9,52	1,55	6,58	2,22	6,89
Prozentual [%]								
Defekte pro Schote	1,13		0,22		7,09		24,50	
Standardabweichung	1,64		0,69		2,98		5,05	
Fisher's Test [p-Wert]								
WT zu <i>recq4A</i>	1							
WT zu <i>wss1A</i>	0,066							
WT zu <i>recq4A wss1A</i>	<0,001							
<i>recq4A</i> zu <i>wss1A</i>	0,014							
<i>recq4A</i> zu <i>recq4A</i>	<0,001							
<i>wss1A</i>								
<i>wss1A</i> zu <i>recq4A wss1A</i>	0,006							

Tabelle 8.25: Rohdaten der Wurzellängenanalyse von *teb wss1A*-Mutanten.

Dargestellt sind die Wurzellängen von *teb wss1A*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Angegeben ist die jeweilige Wurzellänge aus drei verschiedenen Versuchsansätzen in cm, die daraus errechneten Mittelwerte, die Mittelwerte der relativen Wurzellängen, sowie die p-Werte die mittels des zweiseitigen T-Tests mit ungleicher Varianz ermittelt wurden. Die berechneten relativen Mittelwerte sind als Säulendiagramm in Abbildung 8.1 B dargestellt.

Wurzellänge von <i>lig wss1A</i> Mutanten [cm]				
	WT	<i>lig4-5</i>	<i>wss1A-3</i>	<i>lig4-5 wss1A-3</i>
Versuchsansatz 1				
Wurzel 1	6,64	4,24	2,87	0,36
Wurzel 2	6,21	4,22	3,02	0,87
Wurzel 3	7,36	4,16	0,88	0,53
Wurzel 4	6,74	3,51	1,80	0,99
Wurzel 5	7,91	5,80	1,50	1,00
Wurzel 6	5,60	3,56	2,31	0,85
Wurzel 7	7,04	4,60	2,42	1,64
Wurzel 8	7,11	5,84	2,40	1,03
Wurzel 9	6,19	4,15	2,74	1,26
Wurzel 10	7,14	6,01	0,94	0,63
Versuchsansatz 2				
Wurzel 1	5,92	4,98	3,61	0,87
Wurzel 2	6,67	6,22	3,97	0,85
Wurzel 3	7,34	4,72	4,38	1,33
Wurzel 4	5,12	5,13	0,96	1,92
Wurzel 5	6,53	5,69	2,79	1,41
Wurzel 6	5,18	5,64	3,61	2,54
Wurzel 7	5,26	4,88	0,62	1,90
Wurzel 8	7,01	6,04	0,37	1,94
Wurzel 9	5,97	5,28	3,49	0,37
Wurzel 10	6,80	4,44	2,73	1,88
Versuchsansatz 3				
Wurzel 1	5,82	5,30	3,37	1,18
Wurzel 2	4,52	2,21	2,88	1,21
Wurzel 3	3,72	2,89	2,31	1,80
Wurzel 4	6,03	1,83	2,83	0,83
Wurzel 5	5,73	3,52	1,73	1,02
Wurzel 6	3,70	3,89	2,22	0,60
Wurzel 7	6,12	2,10	3,21	1,06
Wurzel 8	6,94	4,16	2,14	1,33
Wurzel 9	4,31	5,19	0,62	1,64
Wurzel 10	5,34	6,29	3,15	0,81
Mittelwert				
Versuchsansatz 1	6,79	4,61	2,09	0,92
Versuchsansatz 2	6,18	5,30	2,65	1,50
Versuchsansatz 3	5,22	3,74	2,45	1,15
Mittelwert [%]				
Versuchsansatz 1	100	67,83	30,74	13,47
Versuchsansatz 2	100	85,80	42,95	24,28
Versuchsansatz 3	100	71,56	46,82	21,97
Gesamt				
Mittelwert [%]	100	75,06	40,17	19,91
Standardabw.	0	9,49	8,40	5,69
T-Test [p-Wert]				
WT zu <i>lig4</i>	0,045			
WT zu <i>wss1A</i>	0,006			
WT zu <i>lig4 wss1A</i>	0,001			
<i>lig4</i> zu <i>wss1A</i>	0,009			
<i>lig4</i> zu <i>lig4 wss1A</i>	0,002			
<i>wss1A</i> zu <i>lig4 wss1A</i>	0,032			

Tabelle 8.26: Rohdaten der Embryonenanalyse von *rmi1 wss1A*-Mutanten.

Dargestellt sind die Embryonenanalyse von *rmi1 wss1A*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Angegeben ist die jeweilige Anzahl an defekten Embryonen pro Schote, die jeweilige Gesamtanzahl an Embryonen pro Schote, die daraus errechneten Mittelwerte und die prozentualen Anteile an defekten Embryonen pro Schote. Weiterhin sind die spezifischen p-Werte, welche mit dem zweiseitigen exakten Test nach Fisher berechnet wurden, angegeben. Die berechneten prozentualen Anteile an defekten Embryonen pro Schote sind als Säulendiagramm in Abbildung 8.2 dargestellt.

Embryonenanalyse von <i>rmi1 wss1A</i>								
	WT		<i>rmi1-2 -/-</i>		<i>wss1A-3 +/-</i>		<i>rmi1-2 -/- wss1A-3 +/-</i>	
	Defekt	Gesamt	Defekt	Gesamt	Defekt	Gesamt	Defekt	Gesamt
Schote 1	0	39	0	39	2	43	12	32,43
Schote 2	0	45	0	45	5	42	11	28,95
Schote 3	0	39	0	45	4	47	9	23,08
Schote 4	0	40	0	41	3	48	10	23,26
Schote 5	0	43	0	44	5	38	9	23,08
Gesamt								
Mittelwert	0	41,20	0	42,80	2	43,60	10,20	39,20
Prozentual [%]								
Defekte pro Schote	0		0		8,89		26,16	
Standardabweichung	0		0		3,62		4,32	
Fisher's Test [p-Wert]								
WT zu <i>rmi1</i>		1						
WT zu <i>wss1A</i>		0,007						
WT zu <i>rmi1 wss1A</i>		<0,001						
<i>rmi1</i> zu <i>wss1A</i>		0,007						
<i>rmi1</i> zu <i>rmi1 wss1A</i>		<0,001						
<i>wss1A</i> zu <i>rmi1 wss1A</i>		0,005						

Tabelle 8.27: Begrifflichkeiten der zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen.

Aufgelistet sind die Begrifflichkeiten der zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen und ihre Herkunft

Begrifflichkeiten der zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen	
k	Anzahl der zu vergleichenden Proben
n.obs	Anzahl der Wiederholungen
df	Freiheitsgrade innerhalb der Gruppen (Fehler)
MS	Mittlere Quadratsumme innerhalb der Gruppen (Fehler)
q-Wert für p<0,05	Ist der Tabelle für den Tukeys Post-Hoc zu entnehmen, ergibt sich aus k und df
kritischer Wert	Wird mithilfe der Differenz der zu vergleichenden Proben errechnet: $kW = q * \sqrt{\left(\frac{MS}{n.obs}\right)}$
Differenz	Absolute Differenz der Mittelwerte der zu vergleichenden Proben. Die Differenz sollte größer sein als der kritischer Wert für einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$

Tabelle 8.28: Begrifflichkeiten der einfaktoriellen ANOVA.

Aufgelistet sind die Begrifflichkeiten der einfaktoriellen ANOVA und ihre Herkunft

Begrifflichkeiten der einfaktoriellen ANOVA	
n₁	Anzahl der Wiederholungen der ersten Probe
n₂	Anzahl der Wiederholungen der zweiten Probe
df	Freiheitsgrade innerhalb der Gruppen (Fehler)
MS	Mittlere Quadratsumme innerhalb der Gruppen (Fehler)
q-Wert für p<0,05	Ist der Tabelle für den Tukeys Post-Hoc zu entnehmen, ergibt sich aus n ₁ und n ₂
SE	Standard Fehler (<i>standard error</i>). Wird mithilfe der Differenz der zu vergleichenden Proben errechnet: $SE = \sqrt{(1/2MS * (\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}))}$
qs	Spezifischer q-Wert. Sollte größer sein als der q-Wert, der der Tabelle entnommen wurde für einen signifikanten Unterschied mit p < 0,05. Wird berechnet durch: qs=Differenz der zu vergleichenden Proben/SE