

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Mechanismus oprav DNA-proteinových
crosslinků u huseníčku rolního**

Diplomová práce

Bc. Kašková Veronika

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Podklad pro zadání DIPLOMOVÉ práce studenta

Jméno a příjmení: **Veronika KAŠKOVÁ**
Osobní číslo: **R190060**
Adresa: **Zahradní 27, Šenov u Nového Jičína, 74242 Šenov u Nového Jičína, Česká republika**
Téma práce: **Mechanismus oprav DNA-proteinových crosslinků u huseníčku rolního.**
Téma práce anglicky: **Mechanism of DNA-protein crosslinks repair in Arabidopsis thaliana.**
Vedoucí práce: **Mgr. Eva Tomašíková, Ph.D.**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracování literární rešerše na téma poškození DNA a mechanismy jeho opravy u rostlin.
2. Selektce homozygotních mutantů pro zes2-19, zes 7-49 a zes3-13 kandidátní geny a validace kandidátních genů.
3. Analýza fenotypu mutantních rostlin a jejich citlivost a chemikálie poškozující DNA.
4. Komplementace mutantních alel funkční kopíí genu ? klonování příslušného genu, transformace do mutantního pozadí, selektce komplementovaných mutantních rostlin, analýza fenotypu.

Seznam doporučené literatury:

1. Stingle J, Jentsch S. DNA-protein crosslink repair. Nat Rev Mol Cell Biol. 2015;16(8):455-760.
2. Recker J, Knoll A, Puchta H. The Arabidopsis thaliana Homolog of the Helicase RTEL1 Plays Multiple Roles in Preserving Genome Stability . Plant Cell. 2014;26(12):4889-902.
3. Diaz M, Pecinka A. Scaffolding for Repair: Understanding Molecular Functions of the SMC5/6 Complex. Genes (Basel). 2018;9(1):36.
4. Liu C, Finke A, Diaz M, Rozhon W, Poppenberger B, Baubec T, Pecinka A. Repair of DNA damage induced by the cytidine analog zebularine requires ATR and ATM in Arabidopsis. Plant Cell. 2015; 27(6):1788-1800).
5. Maple J, Moller SG. Mutagenesis in Arabidopsis. Methods Mol Biol. 2007;362:197-206.

Podpis vedoucího práce:



Datum:

30. 10. 2019

Podpis vedoucího pracoviště:



Datum:

01-11-2019

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE A SOUHRN

Jméno a příjmení autora: Bc. Veronika Kašková
Název práce: Mechanismus oprav DNA-proteinových crosslinků u huseníčku rolního
Typ práce: Diplomová
Pracoviště: Ústav experimentální botaniky AV ČR
Vedoucí práce: Mgr. Eva Dvořák Tomašíková, Ph. D.
Rok obhajoby práce: 2021

Abstrakt:

DNA-proteinové crosslinky jsou vzhledem ke své variabilitě jedním z nejtoxičtějších, ale nejméně prozkoumaných DNA poškození u rostlin. Za účelem lepšího porozumění opravnému mechanismu byl v laboratoři dr. Pečinky navržen dopředný genetický screen pro identifikaci nových faktorů zapojených v opravách DNA-proteinových crosslinků. Díky tomuto dopřednému genetickému screenu jsou vysoce efektivně vybírány nové kandidátní geny, u nichž je analyzováno jejich zapojení do oprav DNA-proteinových crosslinků, a to v závislosti na senzitivitě vybraných rostlin k zebularinu. Zebularin je analog cytidinu, který po inkorporaci do molekuly DNA vytváří kovalentní vazbu mezi DNA methyltransferázou 1 a DNA řetězcem, tím vytváří fyzickou bariéru pro enzymy zprostředkovávající replikaci a transkripci, čímž přímo ohrožuje integritu genomu.

Díky dopřednému genetickému screenu bylo již dříve odhaleno, že se oprav DNA-proteinových crosslinků účastní také SMC5/6 komplex, který hraje zásadní roli v udržování stability genomu odstraňováním komplexních DNA struktur. Navíc tento komplex disponuje širokým spektrem dalších funkcí v DNA metabolismu. Nově identifikovaným genem zapojujícím se do oprav DNA-proteinových crosslinků je pak *RTEL1*. Tato práce je zaměřena na validaci tohoto kandidátního genu, a také na analýzu mechanismu jeho zapojení do oprav poškození DNA, zejména pak na genetickou interakci mezi SMC5/6 komplexem. Analýza byla provedena pomocí dvojitéch mutantů vzniklých křížením rostlin deficientních na *RTEL1* a na určité podjednotky SMC5/6 komplexu.

Klíčová slova: DNA-proteinové crosslinky, zebularin, *Arabidopsis thaliana*, SMC5/6 komplex, RTEL1 helikáza
Počet stran: 69
Počet příloh: 2
Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION AND SUMMARY

Author's first name and surname: Bc. Veronika Kašková

Title: Mechanism of DNA-protein crosslinks repair in *Arabidopsis thaliana*

Type of thesis: Master

Department: Ústav experimentální botaniky AV ČR

Supervisor: Mgr. Eva Dvořák Tomašíková, Ph. D.

The year of presentation: 2021

Abstract:

Due to their variability, DNA-protein crosslinks are one of the most toxic but least studied DNA damage in plants. In order to understand its repair mechanism, the group of Dr. Pečinka designed a forward genetic screen to identify new factors involved in DNA-protein crosslink repair. This allows high efficiency selection of new candidate genes. The involvement of these candidates in DNA-protein crosslink repair is analyzed based, on the sensitivity of selected plants to zebularin. Zebularin is a cytidine analog that, when incorporated into a DNA molecule, forms a covalent bond between DNA methyltransferase 1 and the DNA strand. Thus, zebularine directly compromises genome integrity, by creating a physical barrier to enzymes that mediate replication and transcription. It has previously been revealed that the SMC5/6 complex plays a crucial role in maintaining genome stability by removing complex DNA structures. In addition, this complex provides a wide range of other functions in DNA metabolism. *RTEL1* was identified as one of the the new factors involved in DNA-protein crosslink repair. This work aims at validation of this candidate gene, as well as analysing of the mechanism of its involvement in the repair of DNA damage, especially the genetic interaction between the SMC5/6 complex. The analysis was performed using double mutants created by crossing plants deficient in *RTEL1* and the subunits of the SMC5/6 complex.

Keywords: DNA-protein crosslinks, zebularine, *Arabidopsis thaliana*, SMC5/6 complex, RTEL1 helicase

Number of pages: 69

Number of appendices: 2

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Evy Dvořák
Tomašíkové, Ph. D. a za použití citované literatury.

V Olomouci, dne:

.....

Bc. Kašková Veronika

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Evě Dvořák Tomašíkové, Ph. D. za její odbornou pomoc, množství cenných a inspirativních rad, připomínek a doporučení, a zvláště za velkou trpělivost a vstřícnost během zpracování této diplomové práce. Dále patří mé poděkování technické laborantce Heleně Tvardíkové za její asistenci při náročných experimentech. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i své rodině a přátelům za jejich pomoc a podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED STUDOVANÉ PROBLEMATIKY	3
3.1	Poškození DNA.....	3
3.1.1	Ztráty a modifikace bází.....	3
3.1.2	Zlomy v DNA řetězci	4
3.1.3	DNA-DNA a DNA-proteinové crosslinky	4
3.2	Základní mechanismy oprav DNA.....	6
3.2.1	Bázová excizní oprava.....	8
3.2.2	Nukleotidová excizní oprava.....	8
3.2.3	Mismatch repair.....	9
3.2.4	Nehomologní spojování konců.....	9
3.2.5	Homologní rekombinace	10
3.3	SMC (Structural maintenance of chromosomes) proteinové komplexy.....	13
3.3.1	Kohezin	15
3.3.2	Kondenzin	15
3.3.3	SMC5/6 komplex	15
3.4	Helikázy	18
3.4.1	RecQ.....	19
3.4.2	FANCD1.....	19
3.4.3	RTEL1	20
4	MATERIÁLY A METODY	23
4.1	Biologický materiál	23
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	24
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	25
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	27
4.4.1	Sterilizace semen.....	27
4.4.2	Izolace DNA.....	27
4.4.3	Izolace RNA.....	27
4.4.4	cDNA syntéza.....	28
4.4.5	PCR genotypování.....	28
4.4.6	Elektroforetická separace	29
4.4.7	Selekce homozygotních mutantů pro kandidátní gen <i>zes3-13</i>	29
4.4.8	Analýza dvojíých mutantů.....	31
5	VÝSLEDKY	34
5.1	Kandidátní linie <i>dpcr2</i>	34

5.1.1	Selekce homozygotních mutantů.....	34
5.1.2	Validace kandidátních genů	34
5.1.3	Komplementační křížení	35
5.1.4	Ověření mutace Sangerovým sekvenováním	36
5.1.5	Citlivost identifikovaných kandidátů k zebularinu.....	38
5.2	Analýza fenotypu dvojitých mutantů	38
5.2.1	Selekce dvojitých homozygotních mutantů.....	38
5.2.2	Analýza buněčné smrti u <i>rtell-1 smc6b-1</i> linie.....	39
5.2.3	Měření diferenciální zóny u dvojitých mutantů <i>rtell-1 smc6b-1</i>	40
5.2.4	Efekt mutace na somatický vývoj rostlin	42
5.2.5	Analýza senzitivity ke genotoxickým látkám u dvojitých mutantů <i>rtell-1 smc6b-1</i>	45
6	DISKUSE.....	53
6.1	Analýza buněčné smrti v meristému kořene	54
6.2	Analýza délky diferenciální zóny kořene	55
6.3	Analýza efektu mutace na somatický vývoj rostlin.....	55
6.4	Analýza senzitivity na různá genotoxická činidla	56
6.5	Interakce RTEL1 a SMC6B	58
7	ZÁVĚR.....	59
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60
9	Přílohy	69

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AP	Apurinové/apyrimidinové místo
ATP	Adenosintrifosfát
BC	Buněčný cyklus
BER	Oprava jednoduchým vystřížením báze (<i>angl.</i> Base extension repair)
CDK	Cyklin-dependentní kinázy (<i>angl.</i> Cyclin dependent kinase)
CL	Zřetězení (<i>angl.</i> Crosslink)
CPT	Camptothecin
DNA PK	DNA-dependentní proteinkináza
DNMT	DNA methyltransferáza
DPC	DNA-proteinový crosslink
DSB	Dvojitý zlom v DNA (<i>angl.</i> Double-Strand break)
DSBR	Oprava dvouvláknových zlomů (<i>angl.</i> DSB repair)
EMS	Ethyl methan sulfonát
ERCC1	Endonukleáza excizní opravy 1 (<i>angl.</i> excision repair cross-complementation group 1)
FA	Fanconiho anémie
FLC	Lokus kvetení C (<i>angl.</i> Flowering lokus C)
GG-NER	Globální genomová nukleotidová excizní oprava (<i>angl.</i> Global genomic NER)
H2TH	Helix-two-turn-helix glykosyláza
HhH-GPD	Helix-harpin-helix glykosyláza
HLR	HEAT-like repeat glykosyláza
HPY2	High ploidy 2
HR	Homologní rekombinace (<i>angl.</i> Homologous recombination)
ICL	Crosslink mezi řetězci (<i>angl.</i> Intrestrand crosslink)
ICRF	Bisdioxopiperazine dexrazoxane (ICRF-187)
KITE	Kleisin interagující tandemové elementy (<i>angl.</i> kleisin interacting tandem elements)
MAGE	Melanom asociovaný antigen (<i>angl.</i> Melanoma associated antigen)
MET1	Methyltransferáza 1
MMC	Mitomycin C
MMR	Oprava chybného párování (<i>angl.</i> Mismatch repair)
MMS	Methyl methansulfonát
MMS21	Methyl methansulfonát senzitivní 21
MRN	Proteinový komplex skládající se z Mre11, Rad50 a Nbs1
MS	Murashige a Skoog
NER	Nukleotidová excizní oprava (<i>angl.</i> Nucleotide excision repair)
NHEJ	Nehomologní spojení konců (<i>angl.</i> Non-homologous end joining)
NPA	Nukleoproteinové adukty (<i>angl.</i> Nucleoproteins adducts)

NSE	Non-SMC element
PCNA	Proliferující buněčný jaderný antigen (<i>angl.</i> Proliferating cell nuclear antigen)
RFC	Replikační faktor C (<i>angl.</i> Replication factor C)
RPA	Replikační protein A (<i>angl.</i> Replication protein A)
SCID	Těžká kombinovaná imunodeficiencie (<i>angl.</i> Severe Combined Immunodeficiency Disease)
SDSA	Nasedání řetězce závislé na syntéze (<i>angl.</i> Synthesis dependent strand annealing)
SMC	Strukturní údržba chromozomů (<i>angl.</i> Structural maintenance of chromosomes)
SPRTN	DNA-dependentní metalloproteáza SPARTAN
SSA	Nasedání jednoho vlákna (<i>angl.</i> Single strand annealing)
SSB	Jednoduchý zlom v DNA (<i>angl.</i> Single strand break)
SUMO	Malá ubikvitinu-podobná modifikace (<i>angl.</i> Small Ubiquitin-like Modifier)
TAD	Topologicky asociované domény (<i>angl.</i> Topologically associating domain)
TC-NER	Transkripčně vázaná nukleotidová excizní oprava (<i>angl.</i> Transkription-coupled NER)
TDP1	Tyrosyl-DNA fosfodiesteráza 1 (<i>angl.</i> Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1)
TFIIH	Traskripční faktor II H
TLS	Translézní syntéza (<i>angl.</i> Translesion synthesis)
TOP1	DNA Topoisomeráza 1 (<i>angl.</i> DNA Topoisomerase 1)
XP	Xeroderma pigmentosum
ZEB	Zebularin (1-β-D-ribofuranosyl-1,2-dihydropyrimidin-2-on)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Základní typy DNA poškození.	3
Obrázek 2: Dva hlavní mechanismy HR v somatických rostlinných buňkách.	13
Obrázek 3: Základní struktury SMC komplexů u eukaryot (Haering <i>et</i> Gruber, 2016).....	15
Obrázek 4: Schéma rozvržení v šestijamkové destičce.	33
Obrázek 5: Analýza délky kořene jednotlivých rostlinných linií na ½ MS médiu (mock) a na ½ MS médiu se zebularinem (ZEB).	34
Obrázek 6: Komplementační křížení kandidátní rostliny <i>dpcr2</i> na ½ MS médiu (mock) a na ½ MS médiu se zebularinem (ZEB).	35
Obrázek 7: RTEL1 genové produkty <i>dpcr2</i> kandidátní linie a negativní kontroly W35 s očekávanou velikostí produktů 1222 bp a 685 bp. Sekvence viz Obrázek 9 a 10.	36
Obrázek 8: Elektroforetická separace cDNA <i>dpcr2</i> kandidátní linie s očekávanou velikostí produktu 566 bp. Sekvence viz Obrázek 11.	36
Obrázek 9: Schématické znázornění genu <i>RTEL1</i> u <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
Obrázek 10: Srovnání sekvencí genomové DNA W35 kontrolní linie s <i>dpcr2</i> kandidátní linií, ve které došlo ke záměně cytosinu za adenin v ATP-dependentní helikázové doméně.	37
Obrázek 11: Srovnání cDNA sekvencí W35 kontrolní linie a <i>dpcr2</i> kandidátní linie, u které došlo k vystřížení exonu 15 (jedná se o tzv. splice donor site variantu).	37
Obrázek 12: Analýza délky kořene <i>rtell-1 smc6b-1</i> mutantní linie na ½ MS médiu (mock).	39
Obrázek 13: PCR genotypování <i>rtell-1 smc6b-1</i> dvojitého mutantu na přítomnost inzertní alely <i>smc6b-1</i>	39
Obrázek 14: Analýza buněčné smrti v kořenovém meristému jednotlivých linií.	40
Obrázek 15: Analýza délky diferenciální zóny jednotlivých rostlinných linií.	41
Obrázek 16: Analýza efektu mutace na somatický vývoj dvojitého mutantu <i>rtell-1 smc6b-1</i> v porovnání s jednotlivými rostlinnými liniemi.	43
Obrázek 17: Analýza efektu mutace na somatický vývoj dvojitého mutantu <i>rtell-1 smc6b-1</i> v porovnání s jednotlivými rostlinnými liniemi v horizontální poloze.	44
Obrázek 18: Různé fenotypy <i>rtell-1 nse4a-2</i> dvojitéch mutantů.	50
Obrázek 19: PCR genotypování dvojitého mutantu <i>rtell-1 nse4a-2</i> na přítomnost <i>nse4a-2</i> inzertní alely.	50
Obrázek 20: Fenotyp dospělých rostlin <i>rtell-1 nse4a-2</i> dvojitéch mutantů v porovnání s <i>nse4a-2</i> jednoduchým mutantem a negativní kontrolou Col-0.	51
Obrázek 21: Selektce dvojité homozygotních mutantů <i>rtell-1 hpy2-2</i>	51
Obrázek 22: PCR genotypování dvojitého mutantu <i>rtell-1 hpy2-2</i> na přítomnost <i>hpy2-2</i> inzertní alely.	52
Obrázek 23: Předběžná genetická analýza procentuálního zastoupení dvojité homozygotních mutantů v populaci.	52

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: DNA opravy specifické pro jednotlivé fáze buněčného cyklu.....	7
Tabulka 2: Seznam rostlinných linií.....	23
Tabulka 3: Podmínky kultivace rostlin.....	24
Tabulka 4: Složení reakční směsi a průběh reakce pro cDNA syntézu.....	28
Tabulka 5: Reakční směs pro genotypování.....	28
Tabulka 6: Oligonukleotidy použité pro amplifikaci jednotlivých lokusů.....	29
Tabulka 7: Průběh DNA amplifikace – genotypování.....	29
Tabulka 8: Parametry pro sekvenování s vlastními primery.....	31
Tabulka 9: Přehled koncentrací použitých pro jednotlivé genotoxické chemikálie.....	33
Tabulka 10: Procentuální zastoupení letálních rostlin v populaci.....	52

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Analýza fenotypu <i>rtell-1</i> a <i>dpcr2</i> linie ve srovnání s negativní kontrolou W35 a pozitivní kontrolou <i>smc6b-1</i>	38
Graf 2: Analýza délky diferenciální zóny u jednotlivých rostlinných linií.	42
Graf 3: Analýza senzitivity dvojitého mutanta <i>rtell-1 smc6b-1</i> k zebularinu.....	45
Graf 4: Analýza senzitivity dvojitého mutanta <i>rtell-1 smc6b-1</i> k bleomycinu.....	46
Graf 5: Analýza senzitivity dvojitého mutanta <i>rtell-1 smc6b-1</i> k MMC.....	47
Graf 6: Analýza senzitivity dvojitého mutanta <i>rtell-1 smc6b-1</i> k CPT.....	48
Graf 7: Analýza senzitivity dvojitého mutanta <i>rtell-1 smc6b-1</i> k ICRF.	49

1 ÚVOD

Rostliny jsou vystaveny celé řadě negativních exogenních faktorů, jež mohou poškozovat DNA. Pro jejich přežití je nezbytná rychlá a účinná detekce DNA lézí a jejich následná oprava. U rostlin jsou mechanismy oprav DNA poškození málo prozkoumaným tématem. V laboratoři doc. Pečinky se dlouhodobě zabýváme opravami DNA-proteinových crosslinků, které vytváří genotoxické činidlo zebularin. Zebularin je analogem cytidinu a je schopen vytvářet kovalentní vazbu mezi methyltransferázou 1 (MET1) a DNA řetězcem, čímž tvoří fyzickou bariéru pro enzymy zprostředkovávající replikaci a transkripci. Z tohoto důvodu je oprava DNA-proteinových crosslinků nezbytná pro zachování integrity genomu. Analýza oprav tohoto poškození je založena na výběru kandidátních rostlin z dopředného genetického screenu (z populace mutagenizované EMS činidlem), díky kterým se snažíme identifikovat proteiny zapojené do DNA opravných mechanismů v závislosti na jejich senzitivitě k zebularinu. Pokud kandidátní rostliny vykazují zvýšenou senzitivitu k tomuto genotoxickému činidlu, je pravděpodobné, že gen, jenž je u rostlin vyřazen, bude zapojen do oprav DNA-proteinových crosslinků.

Díky dopřednému genetickému screenu s použitím zebularinu bylo již dříve zjištěno, že se oprav DNA-proteinových crosslinků účastní SMC5/6 komplex, jež je v naší laboratoři podrobně zkoumán. SMC5/6 komplex patří do rodiny komplexů Strukturální údržby chromozomů (SMC), do kterých spadá také kohezin a kondenzin. Tyto proteinové komplexy, jsou klíčovými regulátory dynamiky, struktury a funkce chromozomů u eukaryot. Hlavní funkcí SMC5/6 komplexu je udržování stability genomu odstraňováním komplexních DNA struktur. Nově identifikovaným proteinem zapojeným do oprav DNA-proteinových crosslinků, objeveným v kolektivu skupiny doc. Pečinky, je helikáza RTEL1. V této práci jsem se zabývala potvrzením kandidátního genu *RTEL1* a odhalením mechanismu jeho účinku v DNA opravách. Kromě samotné validace kandidátního genu, byla provedena analýza fenotypu dvojitéch mutantů vzniklých křížením rostliny mutantní v genu *RTEL1* a rostlin deficientních na určitém podjednotku SMC5/6 komplexu. Tato analýza sloužila k posouzení mechanismu účinku těchto proteinů v DNA opravách. Vztah těchto dvou faktorů je důležitý pro podrobnější porozumění mechanismů opravných drah u rostlin.

2 CÍLE PRÁCE

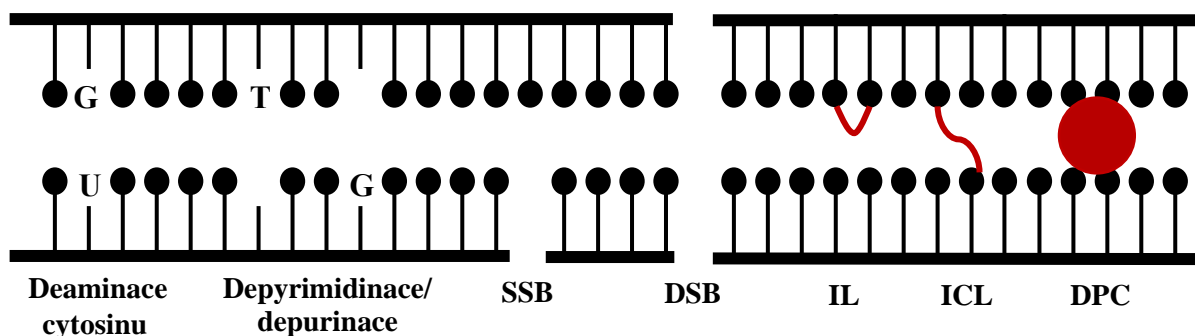
Cíle této práce zahrnovaly zpracování literární rešerše na téma poškození DNA a mechanismy oprav DNA u rostlin. Poté validaci kandidátního genu podílejícího se na opravách DNA-proteinových komplexů u modelového organismu *Arabidopsis thaliana*. Dále zahrnovaly také studium funkce validovaného genu v mechanismech oprav DNA a následně i studium jeho genetické interakce s SMC5/6 komplexem.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED STUDOVANÉ PROBLEMATIKY

3.1 Poškození DNA

Rychlá detekce DNA lézí představuje pro buňku jeden z dílčích cílů přežití. Kromě toho musí být DNA léze také účinně rozpoznána mezi zbytkem odlišných poškození vznikajících v DNA. Tato účinná detekce je obzvláště důležitá pro dělení buněk, při kterém by replikace či segregace chromozomů nesoucích neopravené léze mohla vážně narušit integritu genomu. Ačkoli jsou opravy různých forem poškození DNA závislé na různých sadách proteinů, spouštějí často společné signální dráhy vyvolávající reakci na poškození DNA. Jedním z typických rysů reakce na poškození je zpomalení nebo zastavení buněčného cyklu, díky kontrolním bodům cyklu reagujícím na stav DNA. Mezi další aspekty reakce na poškození pak patří posttranslační modifikace vedoucí ke změnám ve struktuře chromatinu či syntéza proteinů zapojených do oprav poškozené DNA. Rychlost a účinnost reakce na poškození DNA naznačuje, že zapojené signální proteiny jsou velmi citlivé a značně zesilují počáteční stimul (Rouse, 2002).

Poškození jsou klasifikována na základě jejich chemické struktury a také na základě místa jejich vzniku. Nejčastějšími poškozeními jsou modifikace, záměny či ztráty bází, jednovláknové (SSB) či dvouvláknové (DSB) zlomy DNA a DNA-DNA crosslinky v jednom řetězci (IL) nebo mezi dvěma řetězci DNA (ICL), DNA-proteinové crosslinky (DPC) (Moustacchi, 2000).



Obrázek 1: Základní typy DNA poškození.

3.1.1 Ztráty a modifikace bází

Nejčastějším typem endogenního poškození DNA je pravděpodobně vznik AP¹ míst. Ke ztrátě bází dochází v buňce spontánně díky hydrolytickým aktivitám, a to s frekvencí okolo 10 000 ztrát na lidskou buňku za den. Další častou hydrolytickou reakcí je deaminace cytosinu na uracil nebo deaminace adeninu na hypoxantin. Deaminací bází dochází ke změně primární sekvence v DNA řetězci, a pokud nejsou tyto léze opraveny, vede to ke vzniku mutací. Kromě sférického rozpadu bází hydrolyzou se endogenní poškození DNA tvoří také oxidací a alkylací (Seeberg *et al.*, 1995).

Oxidační poškození je zaviněno vysoce reaktivními formami kyslíku, které jsou uvolňovány během přirozeného buněčného dýchání, nebo při zánětlivých reakcích. Reaktivní formy kyslíku mohou

¹ Abazická místa jsou buď apyrimidinová či apurinová místa v řetězci DNA (Seeberg *et al.*, 1995).

poškodit různé formy biomolekul, jako jsou lipidy, proteiny a DNA. Podílí se na mnoha chronických a degenerativních lidských onemocněních a dokonce i na stárnutí organismu (ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) *et al.*, 2005). Oxidací dochází v DNA řetězci k produkci fragmentovaných nebo kruhově otevřených forem pyrimidinů a purinů, a také oxidovaných aromatických derivátů, jež mají sklon k chybnému párování (Seeberg *et al.*, 1995). Příkladem jednoho z nejrozšířenějších oxidačních poškození bází je 8-oxo-7,8-dihydroguanin (Zharkov, 2008).

Alkylační léze v DNA jsou výsledkem jak exogenních látek a alkylačních léků, tak i endogenních molekul. V případě exogenních činidel se jedná především o jednoduchá methylační činidla, např. methylnitrososomočovina, nitrosaminy specifické pro tabák, nebo protirakovinné léky typu temozolomid či streptozotocin (Drabløs *et al.*, 2004). K alkylačnímu poškození dochází často i během procesů normálního metabolismu. Příkladem je S-adenosylmethionin fungující v organismu jako donor methylových skupin v mnoha biochemických reakcích. Tato molekula může chemicky reagovat s DNA za vzniku škodlivých methylací v podobě 3-methyladeninu (Seeberg *et al.*, 1995), nebo 7-methylguaninu (Drabløs *et al.*, 2004). Známým alkylačním činidlem je i ethylmethan sulfonát (EMS), který se používá k indukci změn v genomu v dopředných genetických screenech (Maple *et Møller*, 2007).

3.1.2 Zlomy v DNA řetězci

Jednořetězcové zlomy mohou být v DNA řetězci produkovány různými způsoby, například pomocí rentgenového záření, kyselou hydrolyzou nebo aktivitou nukleáz (Freifelder *et Trumbo*, 1969). Oprava SSB je zásadní pro udržení genomové stability, protože jinak toto poškození generuje toxické dvouřetězcové zlomy při replikaci a ukončuje genovou transkripci (Khoronenkova *et Dianov*, 2015).

Dvouřetězcové zlomy mohou, kromě výše zmíněného způsobu, vznikat i působením exogenních činidel, jako je ionizující záření a chemoterapeutická léčiva, nebo endogenně generovanými reaktivními formami kyslíku a mechanickým namáháním struktury chromozomu (Khanna *et Jackson*, 2001). DSB představují pro buňku jednu z nejnebezpečnějších lézí, proto si organismy vyvinuly vysoce účinné opravné mechanismy konzervované z kvasinek na člověka. Jedná se o homologní rekombinaci (HR) a nehomologní spojování konců (NHEJ), kdy se volba mezi těmito dvěma opravnými cestami u různých organismů liší. Buňky kvasinek se téměř výhradně spoléhají na homologní rekombinaci, zatímco živočichové a rostlinné buňky přednostně využívají NHEJ mechanismu (Gallego *et al.*, 2003).

3.1.3 DNA-DNA a DNA-proteinové crosslinky

Zesítnění neboli crosslink DNA je jedním z nejzávažnějších typů poškození DNA. Tato poškození můžeme rozdělit na crosslinky mezi řetězci DNA (interstrand, ICL), na crosslinky jednoho řetězce (intrastrand, CL) a pak také na crosslinky mezi DNA a proteinem (DPC). Tato poškození vznikají jak různými exogenními zdroji, tak i těmi endogenními. Pokud ICL a DPC zůstanou neopravené před vstupem buňky do S fáze, mohou blokovat replikaci, čímž představují hlavní hrozbu pro integritu genomu. Aby se zabránilo zhroucení replikačních vidlic a narušení buněčného dělení, v organismu

se vyvinuly různé opravné mechanismy řešící tato poškození (přehledně zpracováno v Enderle *et al.*, 2019).

3.1.3.1 CL a ICL

Jelikož je při vzniku CL postiženo pouze jedno vlákno z řetězce je toto poškození opravováno buď prostřednictvím nukleotidové excizní opravy (NER), nebo postreplikačními mechanismy. Oproti tomu jsou opravy ICL, jež postihují obě vlákna DNA, velmi složité a pro korekci postrádají šablonu (Deans *et West*, 2011). Meziřetězcové křížové vazby DNA jsou vysoce toxické pro dělící se buňky, protože indukují mutace, chromozomální přesmyky a buněčnou smrt. Zajímavým aspektem ICL je, že se na jejich opravě podílí řada víceúrovňových mechanismů oprav DNA, včetně NER, HR a postreplikačních opravných systémů (Dronkert *et Kanaar*, 2001). U savců jsou ICL opravovány cestou Fanconiho anémie (FA), která zahrnuje 22 různých FANC genů (Nepal *et al.*, 2017), zatímco v rostlinách je oprava ICL spojena pouze se dvěma konzervovanými geny helikáz FANCI (Dorn *et al.*, 2019) a FANCD1 (Dangel *et al.*, 2014). U *Arabidopsis thaliana* pak byly identifikovány další proteiny podílející se na opravě ICL, například FANL1 nukleáza (Herrmann *et al.*, 2015) či RTEL1, Fe-S klastrová helikáza úzce spjatá s FANCI (Dorn *et al.*, 2019).

3.1.3.2 DPC

K interakcím mezi proteiny a DNA dochází téměř ve všech základních procesech týkajících se DNA a jsou obecně velmi dynamické. Právě tyto přechodné DNA-proteinové interakce mohou být však zachyceny stabilní kovalentní vazbou (Stingele *et Jentsch*, 2015). DPC jsou vysoce škodlivé pro životaschopnost buněk, protože představují velmi objemné adukty, díky čemuž blokují procesy založené na DNA, od replikace až po transkripci (přehledně zpracováno v Stingele *et al.*, 2017).

Jelikož jsou DPC strukturně vysoce rozmanité DNA adukty, vyvinulo se mnoho specifických opravných drah na jejich eliminaci. Bylo prokázáno, že NER mechanismus je schopen chránit buňky před účinky DPC v bakteriích a kvasinkách. Oprava pomocí této dráhy je však omezena velikostí kovalentně připojených proteinů (přehledně zpracováno v Enderle *et al.*, 2019), opravuje především malá poškození a DPC zahrnující proteiny nad 11 kDa většinou opravě tímto mechanismem unikají (Stingele *et Jentsch*, 2015). U *E. coli* se prokázalo, že DPC lze alternativně opravit pomocí homologní rekombinace, která se podílí také na opravách DPC u eukaryot. DPC se navíc neliší pouze kovalentně vázaným proteinem, ale také typem vazby na DNA. To slouží jako další rozeznávací faktor pro aktivaci specializované opravné dráhy (přehledně zpracováno v Enderle *et al.*, 2019).

Exogenní faktory

Příkladem silného induktoru DNA-proteinových crosslinků jsou cytidinové analogy 5-azacytidin, 5-deoxyazacytidin a nově identifikovaný zebularin (Nowicka *et al.*, 2020), který na DNA působí i jako relativně slabé demethylační činidlo. Zebularin je analogem 5-cytidinu a v DNA vytváří nukleoproteinové adukty (NPA) s methyltransferázou 1. Kovalentně navázaná methyltransferáza, působí na vlákne DNA jako fyzická bariéra pro enzymy pohybující se po DNA řetězci. Tímto mechanismem dochází k blokaci procesů probíhajících na DNA, jako je replikace, transkripce či oprava

DNA. U *Arabidopsis thaliana* bylo prokázáno spuštění specifické reakce na poškození DNA, které dominovalo nad změnami methylace v DNA řetězci. Opravy DNA poškozené zebularinem se poté účastní SMC5/6 (Structural maintenance of chromosomes) komplex (Liu *et al.*, 2015), který se u *Arabidopsis thaliana* pravděpodobně podílí na postreplikačních opravách, a to především komplexních nebo objemných lézí (Diaz *et Pecinka*, 2018).

Endogenní faktory

Endogenní DPC mohou vnikat dvěma procesy, v prvním případě se jedná o enzymatické zesílení a v druhém pak o neenzymatické zesílení proteinu a DNA. Mezi enzymy, jež jsou často kovalentně stabilizovány na DNA řetězci, patří především topoizomerázy, apurinové a apyrimidinové (AP) lyázy, DNA glykosylázy, DNA methyltransferázy a DNA polymerázy. Nejlépe prostudovanými jsou DPC zahrnující topoizomerázy 1 (TOP1) (Stingele *et Jentsch*, 2015). Klíčovým rysem tohoto druhu DPC je stabilizovaná tyrosyl-fosfodiesterová vazba mezi řetězcem DNA a proteinem (Wang, 1996). Enzym opravující tuto vazbu je tyrosyl-DNA fosfodiesteraza 1 (TDP1), která kovalentní vazbu přímo hydrolyzuje (Stingele *et al.*, 2017). V přítomnosti SSB nebo zastavených replikačních vidlic zpracovává DPC endonukleáza MUS81, nezávisle na typu proteinu a zesílení. Tento enzym zpracovává DPC zavedením dalšího řezu do protějšího řetězce, čímž vzniká DSB a tím se navozuje oprava cestou HR (Regairaz *et al.*, 2011). Na vlákno je přiveden komplex MRN, který signalizuje poškození a zároveň upravuje konce zlomu (Hacker *et al.*, 2020). K výsledné opravě je také potřeba degradace proteinové části DPC, což zajišťuje metaloproteináza WSS1, na níž je silně závislý TDP1 protein (Stingele *et al.*, 2014).

Neenzymatické DPC mohou, oproti enzymatickým DPC, potenciálně zahrnovat jakýkoli enzym nacházející se v blízkosti DNA. Zesílení může být způsobeno různými činidly, včetně různých typů záření, iontů těžkých kovů a reaktivních sloučenin jako jsou aldehydy. Navíc může docházet k produkci některých typů reaktivních sloučenin přímo činností metabolismu. Příkladem lze uvést vysoce reaktivní acetaldehyd, jenž se metabolizuje v procesu oxidace ethanolu. Dobrým příkladem je také uvolňování formaldehydu vznikajícího při deacetylaci a acetylaci histonů na chromatinu, protože formaldehyd je extrémně účinný při zesílení proteinů a DNA, díky tomu je pak využíván jako experimentální činidlo k zachycení přechodných DNA-proteinových interakcí na chromatinu v imunoprecipitačních testech (Stingele *et Jentsch*, 2015). Genetické studie dále odhalily, že pro opravy nebo prevenci DNA aduktů tvořených acetaldehydem jsou stěžejní opravné dráhy NER, HR a cesta Fanconioho anémie (Klages-Mundt *et Li*, 2017).

3.2 Základní mechanismy oprav DNA

DNA sloužící jako trvalá kopie buněčného genomu, může podléhat řadě chemických reakcí a změny v její struktuře jsou velmi významné. Mutace v DNA mohou vznikat buď spontánně nebo v důsledku expozice chemikáliím či záření. Poškození řetězce pak může blokovat replikaci nebo transkripci, což může zvyšovat frekvenci vzniku dalších mutací. Aby byla integrita genomu zachována,

musely si buňky vyvinout mechanismy pro opravu DNA (Cooper, 2000), kdy se odhaduje, že každá jednotlivá lidská buňka musí každý den opravit 10 000 – 20 000 lézí DNA (Lindah, 1993).

Je známo nejméně pět základních opravných cest: básová excizní oprava, nukleotidová excizní oprava, oprava chybného párování, oprava homologní rekombinací a oprava nehomologním spojením konců. Tyto opravné cesty jsou aktivní v různých fázích buněčného cyklu a zajišťují tak reparaci poškozené DNA (Chatterjee *et Walker*, 2017). DNA léze aktivují dráhy kontrolních bodů, které regulují specifické mechanismy DNA oprav v různých fázích buněčného cyklu (BC). Buňky se zastaveným kontrolním bodem buď obnovují progresi buněčného cyklu po opravě DNA poškození, nebo pokud lézi nelze opravit, zahajují apoptózu. Pro buňku je tedy zásadní lézi v DNA opravit, kdy volba použitého opravného systému závisí nejen na typu léze ale i na fázi buněčného cyklu. Koordinace drah DNA oprav a buněčného cyklu je řízena aktivitami cyklin-dependentních kináz (CDK). Tyto enzymy regulují přechody buněčného cyklu indukci degradace proteinů inhibujících progresi buněčného cyklu a jsou periodicky aktivovány svými regulačními cyklinovými podjednotkami, jež jsou exprimovány s různou mírou během jednotlivých fází BC (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: DNA opravy specifické pro jednotlivé fáze buněčného cyklu.

	Fáze buněčného cyklu		
	G1	S	G2-M
SSB nebo DSB	NHEJ mechanismus	Opravení zastavené replikační vidličky pomocí HR	HR mechanismus
Záměny bází/ Nesprávné párování bází	-	MMR mechanismus	-
Větší léze	NER mechanismus	TLS mechanismus	-

Dvouřetězcové zlomy, které vznikají v G1 fázi jsou opravovány výhradně prostřednictvím nehomologního spojování konců, zatímco DSB vytvářející se během S a G2 fáze cyklu podléhají opravám pomocí homologní rekombinace, kdy je k dispozici homologní templát. Mismatch repair (MMR) mechanismus je velmi důležitý pro opravu nesprávného párování bází či malých inzercí a delecí vygenerovaných chybnou replikací. Další důležitou opravnou dráhou je také nukleotidová excizní oprava (NER), jejíž role je stěžejní hlavně v G1 fázi při opravě objemných lézí. Pokud nejsou tyto léze z DNA odstraněny, může docházet k blokaci DNA polymerázy na řetězci. Replikace pak pokračuje obcházením těchto lézí bypassem pomocí specializované translézní syntézy (TLS) (Branzei *et Foiani*, 2008). Vzhledem k charakteru mé diplomové práce se podrobněji budu věnovat především dráze homologní rekombinace.

3.2.1 Bázová excizní oprava

Mechanismem bázové excizní opravy (BER) se opravují poškození DNA způsobená oxidací, deaminací, nebo alkylací, přičemž takto vzniklé léze bází způsobují malé změny struktury DNA šroubovice (Krokan *et* Bjoras, 2013). BER je nezbytnou opravnou cestou, její deficit ovlivňuje stabilitu genomu a je spojen s mnoha chorobami, předčasným stárnutím, neurodegenerací a rakovinou (Dianov *et* Hübscher, 2013). Oprava je zahájena specifickou DNA glykosylázou, jež štěpí N-glykosylovou vazbu spojující lokalizovanou bázi a deoxyribózu. Vzniklé abazické místo je následně zpracováno AP endonukleázami. Tyto enzymy štěpí fosfodiesterovou vazbu na 5' konci od AP místa, čímž se vytvoří jednoduchý zlom v řetězci. SSB obsahuje hydroxylový zbytek na 3' konci a deoxyribofosfát na 5' konci, což umožní začlenění nového nukleotidu DNA polymerázou a následné spojení řetězce DNA ligázou (Dianov *et* Hübscher, 2013). Většina DNA glykosyláz odstraňuje několik strukturně odlišných poškození bází, avšak existují i DNA glykosylázy s velmi úzkou substrátovou specifitou (Krokan *et al.*, 1997).

Znalosti o rostlinné dráze BER v posledních dvou desetiletích značně pokročily, a to zejména díky studiím na modelovém organismu *Arabidopsis thaliana*. Dosud získané výsledky naznačují, že rostliny mají ortology většiny genů BER dráhy, avšak mají také některé rostlinně specifické BER proteiny (Roldán-Arjona *et al.*, 2019). U rostlin bylo například identifikováno pět strukturních superrodin DNA glykosyláz, kdy se každá z nich specializuje na určitý typ poškození, nebo na řadu strukturně souvisejících lézí (Dalhus *et al.*, 2009). Průběh BER mechanismu v rostlinách se nijak zvlášť od ostatních organismů neliší (Roldán-Arjona *et al.*, 2019).

3.2.2 Nukleotidová excizní oprava

Klíčovou charakteristikou nukleotidové excizní opravy (NER) je sada enzymů rozpoznávající jak adukty indukované UV zářením, či environmentálními mutageny, tak i léze vzniklé při endogenních oxidačních reakcích. Tato poškození nesdílejí podobnost v chemické struktuře, ale jejich společným rysem je destabilizace duplexu DNA. Základem jejich lokalizace je narušení párování bází, ohybu a flexibility řetězce (Scharer, 2013). Deficit této dráhy je spojen s onemocněním Xeroderma pigmentosum (XP)² (Reardon *et* Sancar, 2005), podle kterého bylo označeno sedm rozličných skupin genů (XP geny) této dráhy. Tyto geny jsou nezbytné pro správnou funkci NER mechanismu (Laat *et al.*, 1999), ale oprava léze vyžaduje kromě XP genů také další faktory jako je replikační protein A (RPA), transkripční faktor II H (TFIIH) a nukleázu pro excizi DNA (ERCC1) (Wood, 1997). Základem opravy je tvorba zářezů z každé strany léze v řetězci a uvolnění poškozeného fragmentu o velikosti 24-32 nukleotidů (pro prokaryotní organismy se uvádí délka fragmentu 12-13 nukleotidů) (Reardon *et* Sancar, 2005), kdy je celý proces ukončen DNA polymerázou (δ či ϵ) a DNA ligázou (Wood, 1997).

² Onemocnění projevující se silnou precitlivělostí na sluneční záření a vyšším rizikem vzniku rakoviny kůže (Reardon *et* Sancar, 2005).

UV záření u rostlin, ačkoli se před jeho nepříznivými vlivy chrání syntézou molekul, které jej absorbují, do rostlinných tkání proniká a poškozuje je (Liu *et al.*, 2000). Rostliny obsahují homology většiny genů zapojených do opravného mechanismu NER. Některé velmi významné geny této dráhy nebyly u rostlin doposud nalezeny, na druhou stranu však obsahují určité geny i přídatné faktory zapojující se do oprav ve více kopiích (Kimura *et Sakaguchi*, 2006). Mechanismus NER opravné dráhy je založen stejně jako u lidí a jiných eukaryot na dvojitém řezu, kde je úsek o délce 26-27 nukleotidů u rostlin vystřižen a odstraněn z řetězce ve vazbě na jaderný faktor TFIIH (Canturk *et al.*, 2016)

3.2.3 Mismatch repair

MMR mechanismus je zodpovědný především za korekci chybného párování bází, insercí a delecí (indelů) v řetězci vznikajícího během replikace DNA. Poruchy MMR jsou spojeny s nestabilitou celého genomu, zejména kvůli zvýšení mutační rychlosti, což vede k predispozici k určitým typům rakoviny, příkladem lze uvést dědičný nepolypózní kolorektální karcinom (Li, 2008). Základ této dráhy tvoří heterodimerní komplexy proteinů (Kunkel *et Erie*, 2005), kdy je MSH2-MSH6 komplex odpovědný za opravu především chybného párování bází (Kolodner *et Marsischky*, 1999), zatímco komplex MSH2-MSH3 opravuje v řetězci vzniklé inserce a delece, které mohou mít až 16 dalších nukleotidů v řetězci (Kunkel *et Erie*, 2005). Opravy se účastní také protein MED1 s endonukleázovou aktivitou a úzce související s DNA glykosylázami, jenž napomáhá rozpoznat nově syntetizované vlákno v interakci s proteiny replikačního komplexu (Harfe *et Jinks-Robertson*, 2000). Do MMR je zapojena také řada dalších proteinů, jako jsou polymeráza δ a ϵ , RPA protein, PCNA, RFC, exonukleáza I a FEN1 endonukleáza (Kolodner *et Marsischky*, 1999).

V rostlinách rozpoznávání různých lézí pomocí MMR umožňuje důsledně potlačovat mutace během mitotického dělení meristematických buněk, které jsou základem generativních orgánů, u nichž je nezbytné, aby byly bez mutací. Proteiny MMR dráhy mohou být využívány také k antagonizaci homologní rekombinace mezi částečně odlišnými sekvencemi DNA. V rostlinách byly kromě ortologů eukaryotických proteinů MMR nalezeny i rostlinně specifické proteiny, které se v komplexu pravděpodobně váží především na nesoulad bází G/T vznikajících v nereplikující se DNA prostřednictvím deaminace 5-methylcytosinu na motivech mCpG a mCpNpG, které jsou v rostlinách obzvláště časté. Alternativně může tento komplex rozpoznávat chyby v replikaci spojené nebo sousedící s 5-methylcytosinem (Wu, 2003).

3.2.4 Nehomologní spojování konců

Na rozdíl od homologní rekombinace, nehomologní spojení konců DNA spojuje rozbité konce DNA ve všech fázích buněčného cyklu a je převládajícím opravným mechanismem v savcích i v rostlinných buňkách (Burma *et al.*, 2006). DSB tak mohou být opraveny rychlejší cestou, než je homologní rekombinace, oprava však není úplně přesná. NHEJ se iniciuje na DSB navázáním heterodimeru Ku70/Ku80. Tento heterodimer se na volné konce DNA váže ve formě kruhové molekuly a strukturálně jej zpevňuje, aby usnadnil opětovné spojení (Helleday, 2003).

Afinita KU komplexu k DSB je mimořádně vysoká, díky čemuž se komplex na DSB lokalizuje v několika sekundách od jeho vzniku. KU komplex se díky své prstencovité struktuře váže na sacharidovou páteř DNA, a ne na báze, což vysvětluje schopnost komplexu se vázat na DNA způsobem nezávislým na sekvenci. Jakmile je KU komplex navázán na konce DSB slouží okamžitě jako lešení pro nábor dalších faktorů NHEJ mechanismu do místa poškození. Zásadní interakcí, je pak interakce KU80/70 s DNA dependentní proteinkinázou (DNA PK) patřící do rodiny fosfatidylinositol-3 kináz (PI-3), která umožňuje aktivaci ATM a ATR proteinkináz (Davis *et* Chen, 2013). Pro konce, které nejsou správně upraveny a neobsahují na 3' konci hydroxylovou a na 5' konci fosfátovou skupinu, je zapotřebí dalších faktorů. V savčím organismu můžeme nalézt velkou sadu enzymů pro správnou úpravu konců, kdy nejznámějším proteinem, jenž slouží k tomuto účelu je ARTEMIS nukleáza, objevena jako gen mutovaný u většiny pacientů s těžkou radiosenzitivní T-B-kombinovanou imunodeficiencí (SCID) (Gent *et* Burg, 2007). ARTEMIS je 5'-3' exonukleáza interagující s DNA PK, pomocí níž je fosforylována. Po připojení se ke komplexu DNA PK s KU70/80 získává ARTEMIS endonukleolytickou aktivitu se schopností otevřít vlásenkovou strukturu během rekombinace a odstranit 5' a 3' vyčnívající konce, tak aby byly vhodné pro opravu (Burma *et al.*, 2006). Posledním krokem v NHEJ dráze je ligace DNA konců komplexem ligázy IV/XRCC4 (Gent *et* Burg, 2007).

V rostlinách se dvojitě zlomy v DNA opravují primárně NHEJ mechanismem (Gorbunova, 1997). NHEJ může vést ke vložení sekvencí z jiného místa genomu, ale mnohem častěji dochází k prostému spojení konců často vedoucího ke vzniku delecí. Navíc pokud je prostřednictvím NHEJ opravován více než jeden DSB současně, může také dojít k inverzím či translokacím. Vzhledem k tomu, že u rostlin mohou být somatické změny přenášeny do zárodečné linie a tím přeneseny do další generace je NHEJ jeden z důležitých faktorů udržování genomu (Knoll *et al.*, 2014). U rostlin se do této dráhy klasicky zapojují opravné faktory, které byly popsány již výše, jako je KU70/80 komplex vážící se na konce poškozené DNA a rekrutující další faktory včetně komplexu DNA ligázy IV/XRCC4 (Lloyd *et al.*, 2012).

3.2.5 Homologní rekombinace

Homologní rekombinace (HR) zahrnuje řadu vzájemně souvisejících drah, které fungují při opravě dvouvláknových zlomů DNA a mezivláknových křížových vazeb (ICL) (Li *et* Heyer, 2008). Ze živočišných systémů pak víme, že se komponenty homologní rekombinace (Karpenshif *et* Bernstein, 2012), například RTEL1 helikáza, podílejí na opravách DPC (Sparks *et al.*, 2019). Rekombinace poskytuje navíc podporu při replikaci DNA pro obnovu zastavených či poškozených replikačních vidlic, čímž se podílí na zvyšování tolerance proti poškození DNA (Li *et* Heyer, 2008).

Homologní rekombinace zajišťuje přesnou opravu pomocí nepoškozené sesterské chromatidy nebo homologního chromozomu sloužícího jako předloha (Essers, 2000). Klíčovým eukaryotickým proteinem této dráhy je RAD51 homologní k prokaryotickému RECA proteinu. Vytváří nukleoproteinové vlákno, katalyzuje hledání homologních sekvencí, párování řetězců a jejich výměnu. Vyřazení genu *RAD51* je embryonálně letální, podobně jako vyřazení dalších genů zapojených do HR

dráhy. Z toho vyplývá, že intaktní HR mechanismus je nezbytný pro funkci organismu. Jako homologní sekvence nutné pro invazi řetězce závislého na RAD51, se využívají zejména sesterské chromatidy, proto je HR možná pouze v pozdních S fázích nebo G2 fázích buněčného cyklu (Helleday, 2003).

Zásadním počátečním krokem HR je generace stabilní ssDNA s přesahem na 3' konci. Zpracování konců zahrnuje komplex MRE11/RAD50/NBS1 u savců nazývaný též jako MRN komplex (MRX u prokaryot) a protein CtIP (SAE2 u prokaryot). CtIP slouží k naložení RPA proteinu na ssDNA a pro spuštění dráhy ATR kinázy. Rozsáhlejší resekce provádí 5'-3' exonukleáza EXO1 nebo enzymy s kombinovanou aktivitou helikázy/nukleázy, u savců BLM, u prokaryot SGS1/DNA2. Protein RAD51 hydrolyzou ATP podporuje disociaci nově vzniklé heteroduplexní DNA a vytlačení jednoho řetězce. RPA protein se okamžitě váže na ssDNA a soutěží o vazbu s RAD51, který se musí seskupit s mediátorovými proteiny. Zásadními mediátory jsou u kvasinek proteiny RAD52 a u savců proteiny BRCA2, v případě že jsou tyto proteiny nefunkční, dojde k narušení vazby RAD51 na DNA (Jasin *et Rothstein*, 2013). V průběhu správné HR pak dochází ke vzniku meziproductů v podobě Hollidayových spojů, dochází k syntéze DNA a nakonec k ligaci zářezů v sekvenci (Baumann *et West*, 1998).

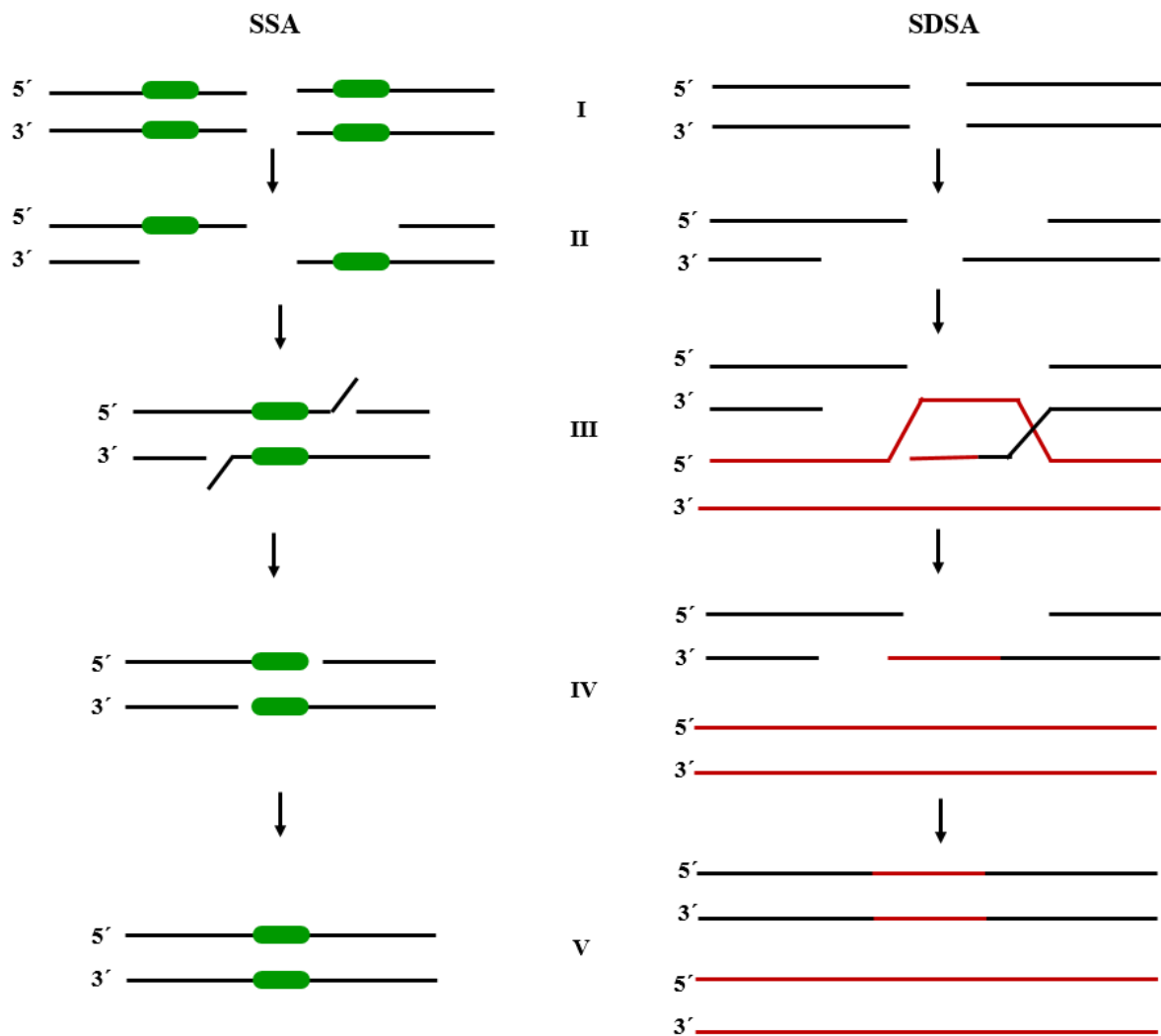
Základní mechanismus opravy homologní rekombinací zůstal zachován i u rostlin. Během replikace a oprav DNA vznikají u rostlin také složité DNA struktury, a to v podobě dvojíých Hollidayových spojů, nebo zastavených replikačních vidlic. Tyto meziproducty jsou zpracovány endonukleázou MUS81, helikázami RECQ a proteinem RAD5A. DNA léze v řetězci templátu blokující progresi replikační vidlice jsou opravovány zejména mechanismem postreplikačních oprav, v němž hraje hlavní úlohu faktor RAD5. Tento mechanismus zaručuje dokončení replikace DNA i v případě jejího poškození (Mannuss *et al.*, 2010). RECQ4A z rodiny proteinů RECQ působí společně s proteinem MUS81 v paralelních drahách, které mají za úkol odstraňovat meziproducty vznikající při replikaci DNA. Genetická analýza prokázala, že pokud jsou obě tyto dráhy vyřazeny, je další replikace blokována a rostliny odumírají (Bleuyard *et al.*, 2004). U *Arabidopsis thaliana* hraje pak prominentní roli v HR také protein RAD51C (Mannuss *et al.*, 2010), kdy je role paralogů RAD51 při opravách DNA mezi rostlinami a obratlovci zachována (Bleuyard *et al.*, 2004).

3.2.5.1 Mechanismy HR

V rámci HR můžeme rozlišit několik opravných systémů, podle templátu využitého k opravě DNA. Mechanismy spadající pod HR jsou single strand annealing (SSA), synthesis dependent strand annealing (SDSA) (Obrázek 2) a double strand break repair (DSBR). Single strand annealing je opravný mechanismus, který lze efektivně využít, pokud jsou dvě homologní sekvence uspořádány v těsné blízkosti v tandemové orientaci. Tento způsob oprav je u rostlin poměrně častý, protože obsahují velké množství repetice a duplikovaných genů. Mechanismus je založený na indukci DSB, kdy se pomocí resekce katalyzované exonukleázou vytvoří jednořetězcové přesahy, které jsou alespoň částečně komplementární. Tyto molekuly na sebe pak mohou nasedat a vytvářet tak chimérickou strukturu DNA. Převisy na 3' koncích jsou oříznuty, jednořetězcové mezery jsou vyplněny DNA polymerázou a spojení

řetězců je dokončeno DNA ligázou. SSA může v somatických rostlinných buňkách probíhat téměř stejně účinně jako NHEJ mechanismus (Siebert *et Puchta*, 2002).

Existují pak ještě dva obecné mechanismy pro konzervativní opravu DSB, jedná se o SDSA a DSBR, oproti SSA však pracují bez ztráty genetické informace. V somatických rostlinných buňkách je hlavním mechanismem konzervativní HR opravy SDSA. V SDSA dochází po resekci 3' konců DSB k invazi jednoho vlákna do homologního templátu. Tím se vytváří takzvaná D-smyčka a následně se zahajuje syntéza DNA pomocí nově spárovaného řetězce sloužícího jako templát. V určitém časovém bodě se pak syntéza zastaví, prodloužené vlákno se uvolní z D-smyčky a hybridizuje s komplementárními sekvencemi vlákna, jež je výsledkem resekce druhého konce zlomu. Po opravě jednořetězcových mezer se tak obnoví genetická informace poškozené dvouvláknové DNA molekuly. SDSA rekombinace vyžaduje pouze jednu homologní oblast na jednom z konců DNA řetězce. Pro DSBR rekombinaci je nezbytná homologie obou konců přerušené sekvence (Puchta, 1998). DSBR mechanismus je důležitý během meiotické rekombinace, kde proces crossing overu zajišťuje promíchání rodičovské informace. V DSBR dochází mezi molekulami DNA ke tvorbě dvojitych Hollidayových spojů, rekombinačních produktů, které se musí odstranit, což má za následek buďto crossing over nebo genovou konverzi (Knoll *et al.*, 2014).



Obrázek 2: Dva hlavní mechanismy HR v somatických rostlinných buňkách.

SSA neboli single strand annealing a SDSA synthesis dependent strand annealing. Po vytvoření DSB (I) v obou drahách dochází k resekci řetězce a tvorbě přesahů na 3' koncích jednotlivých řezů (II). V případě SSA je dalším krokem přímé nasedání/annealing komplementárních jednoduchých řetězců (III). Veškerá sekvenční informace mezi komplementárními opakováními je znovuspojením molekuly ztracena (IV). V případě SDSA volný 3' konec vlákna napadne homologní dvoušroubovici DNA a iniciuje replikaci pomocí templátu (III). Poté je vlákno uvolněno a nasedá na vlákno tvořící druhou stranu DSB (IV), dochází opět k syntéze a vytváří se dsDNA molekula bez ztráty genetické informace (V) (Knoll *et al.*, 2014).

3.3 SMC (Structural maintenance of chromosomes) proteinové komplexy

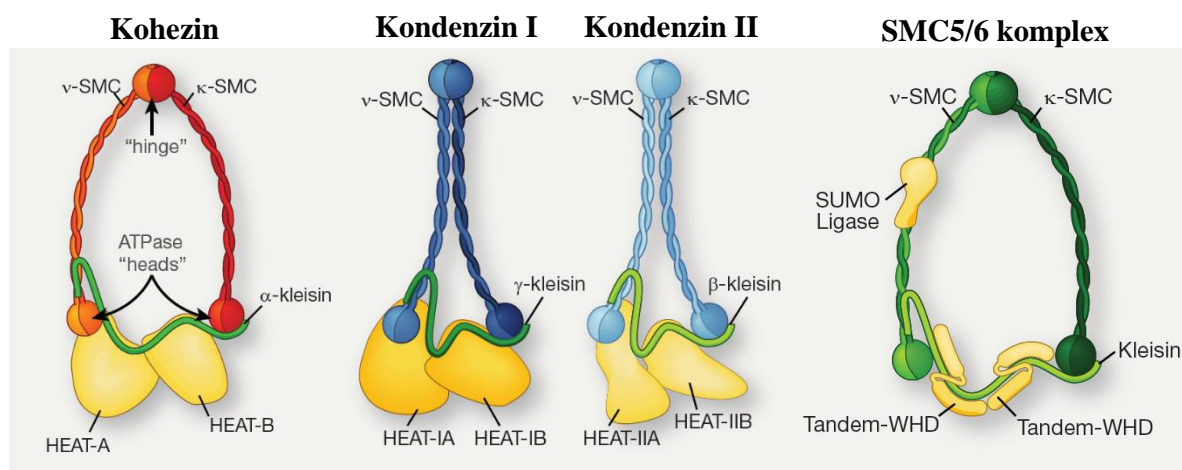
Eukaryotický genom je organizován do lineárních chromozomů, kdy je DNA vázána na histonové oktamery, čímž dochází ke tvorbě nukleosomů, primárních chromatidových jednotek skládajících se do chromatinových vláken. Tato vlákna se posléze sdružují do domén o různé hustotě a přístupnosti. Jak již bylo popsáno v předchozích kapitolách, stabilita chromatinu je však ohrožována jak endogenními, tak i exogenními faktory. Tyto faktory ohrožují stabilitu genomu širokou škálou

toxických poškození a neopravené nebo nesprávně opravené léze vedou k mutacím ohrožujícím funkčnost genů, kdy dokonce mohou způsobit i jejich ztrátu, čímž indukují nestabilitu genomu (Diaz *et Pecinka*, 2018).

Během buněčných aktivit dochází k remodelaci chromatinu (Alabert *et Groth*, 2012), kdy jsou klíčovými faktory pro tyto procesy SMC komplexy, mezi něž patří kohezin, kondenzin a také SMC5/6 komplex (Uhlmann, 2016). Structural maintenance of chromosomes (SMC) komplexy jsou klíčovými regulátory dynamiky, struktury a funkce chromozomů u eukaryot (Diaz *et Pecinka*, 2018). Základním molekulárním mechanismem, kterým SMC komplexy působí na reorganizaci chromozomů, je jejich schopnost vytvářet a postupně zvětšovat smyčky DNA v procesu zvaném vytlačování smyčky. Tento jednoduchý mechanismus může přiblížit dva vzdálené elementy na stejné molekule DNA do těsné fyzické blízkosti. Příkladem jsou enhancery, jež mohou být vzdálené od cílových sekvencí stovky párů kilobází a tento mechanismus pak umožňuje jejich zacílení na promotory, které regulují aktivaci genové exprese. Vytlačování smyčky dále poskytuje elegantní metodu skládání chromatinového vlákna do mitotických chromozomů. Ve výpočetních simulacích, které využívají fyzikální vlastnosti polymerů, může vytlačování smyčky skutečně odpovídat za dynamickou sub-kompartimentalizaci genomu do topologicky asociovaných domén (TAD), jakož i za tvorbu mitotických chromozomů a individualizaci sesterských chromatid. Samotný proces je však nejasný a je navrženo vícero odlišujících se modelů vytlačování DNA smyček (Hassler *et al.*, 2018).

Základní struktura SMC komplexů, tedy SMC část, je evolučně konzervována z bakterií na člověka. Prokaryota však obsahují pouze jeden SMC protein, ten vytváří homodimer (Losada, 2005), který se posléze shromažďuje s dalšími podjednotkami a formuje tak SMC komplex, jenž hraje klíčovou roli v úspěšné segregaci bakteriálního nukleoidu (Hassler *et al.*, 2018). U eukaryotických organismů pak můžeme najít šest různých SMC proteinů. Ty vytvářejí heterodimery ve specifických kombinacích: SMC1 a SMC3 tvoří komplex kohezinu, zatímco SMC2 a SMC4 jsou ústředními složkami kondenzinových komplexů. SMC5 a SMC6 jsou součástí SMC5/6 komplexu zapojeného do DNA oprav (Losada, 2005) (viz Obrázek 3).

SMC proteiny jsou velké polypeptidy využívající energii z hydrolýzy adenosintrifosfátu (ATP) k řízení konformačních změn v topologii DNA (Hassler *et al.*, 2018). Na svých N- a C- koncích obsahující globulární domény disponující právě touto ATP-dependentní DNA vazebnou aktivitou. Primárním krokem k vytvoření funkčního SMC komplexu je složení SMC proteinů v pantové doméně a jejich propojení s globulárními doménami pomocí ramen (Kanno *et al.*, 2015). Komplexy SMC tak tvoří jedinečné struktury ve tvaru prstence nebo písmene V s dlouhými rameny stočenými do cívky a fungují jako ATP modulované, dynamické molekulární linkery genomu (Losada, 2005). Heterodimerní kostra těchto komplexů slouží jako strukturální komponenta pro vazbu dalších, non-SMC podjednotek, které se liší v závislosti na komplexu (Haering *et Gruber*, 2016).



Obrázek 3: Základní struktury SMC komplexů u eukaryot (Haering *et Gruber*, 2016).

SMC a non-SMC podjednotky se skládají do tří funkčně rozdílných komplexů – kohezinu, kondenzinu a SMC5/6 komplexu.

3.3.1 Kohezin

Ve struktuře kohezinu asociuje heterodimer SMC1-SMC3 s podjednotkami SCC1 komplexu známými jako MCD1/RAD21, a také s podjednotkami SCC3/SA (Haering *et al.*, 2002). SCC1 komplex je zařazen do třídy takzvaných kleisinových proteinů zahrnujících kondenzinové podjednotky CAP-H a CAP-H2. Kohezin udržuje pohromadě především sesterské chromatidy (Hassler *et al.*, 2018), a to pomocí své prstencové struktury, kdy mezi ramena komplexu přijme duplexní molekuly DNA (Losada, 2005). Komplex je také zodpovědný za dynamickou kompartmentalizaci chromozomů do TAD během interfáze (Hassler *et al.*, 2018) a spolu s SMC5/6 komplexem je zapojen do oprav DSB v G2 fázi (Watanabe *et al.*, 2009).

3.3.2 Kondenzin

SMC2 a SMC4 proteiny tvoří základ komplexu kondenzinu. Buňky obratlovců obsahují dva různé kondenzinové komplexy, kondenziny I a kondenziny II. Vyznačují se svými různými, jedinečnými, a přesto příbuznými sadami regulačních podjednotek. Příkladem jsou CAP-D2 a CAP-G regulační podjednotky kondenzinu I a CAP-D3 a CAP-G2 podjednotky kondenzinu II obsahující HEAT repetice sloužící k protein-proteinovým interakcím. Dalšími regulačními jednotkami jsou CAP-H a CAP-H2 patřící do rodiny kleisinů. Tyto regulační podjednotky se vážou na globulární doménu heterodimeru SMC (Losada, 2005). Kondenzinový komplex je zodpovědný za kondenzaci mitotických chromozomů, segregaci sesterských chromatid a podílí se také na změnách genové exprese a DNA opravách (Rana *et Bosco*, 2017).

3.3.3 SMC5/6 komplex

Hlavní aktivitou SMC5/6 komplexu je udržování stability jaderného genomu odstraňováním komplexních DNA struktur. Tento komplex plní řadu funkcí, příkladem lze uvést kontrolu jednosměrné replikace rDNA, odstranění toxických meziproductů DNA během replikace a rekombinace DNA, prevenci homologní rekombinace mezi nehomologními sekvencemi a alternativní prodlužování telomer.

Komplex SMC5/6 může být spojen až se šesti podjednotkami non-SMC element (NSE), které sestavují tři různé subkomplexy: NSE1-NSE3-NSE4, NSE5-NSE6 a NSE2-NSE5-NSE6 (přehledně zpracováno v Diaz *et Pecinka*, 2018). Tyto odlišné strukturální subkomplexy, pak zřejmě mohou zprostředkovat odlišné, specifické funkce nebo interakce (Aragón, 2018).

Subkomplexy SMC5-SMC6-NSE2/MMS21

Jádro subkomplexu tvoří SMC5 a SMC6 proteiny, které spolu stejně jako ostatní SMC heterodimery interagují pomocí svých pantových domén, kdy se ukázalo, že konzervované glycinové zbytky v pantech SMC5 a SMC6 jsou pro tuto interakci nezbytné (Sergeant *et al.*, 2005). Bodové mutace v těchto genech oslabují interakci mezi proteiny a tím i sílu spojení, což ohrožuje celkovou funkci komplexu. Nejvíce konzervovanou část komplexu představuje jádro dvou SMC proteinů a podjednotky NSE2/MMS21 s funkcí SUMO E3 ligázy (Aragón, 2018), kdy prostřednictvím NSE2/MMS21 dochází k enzymatické regulaci dynamiky celého komplexu (Diaz *et Pecinka*, 2018). NSE2 se váže na šroubovicovou strukturu SMC5 v N-terminální oblasti, zatímco RING doména zodpovědná za aktivitu SUMO ligázy spočívá na C-terminálním konci proteinu. Tato konformace je zřejmě důležitá pro dosah SUMO ligázy k substrátům zatímco je podjednotka pevně vázaná ke komplexu (Aragón, 2018). SUMO modifikace se účastní mnoha buněčných procesů, jako je cytosolický transport, transkripční regulace, apoptóza, stabilita proteinů, reakce na stres a progresse buněčného cyklu. Mezi proteiny, jež jsou sumoylované NSE2/MMS21 patří například SMC6, NSE3 a NSE4, nebo SMC5 a KU70 (Potts *et Yu*, 2005). Jediným prozatím popsaným cílem HPY2 u rostlin byla podjednotka SMC5/6 komplexu, protein NSE4 (Rytz *et al.*, 2018).

Subkomplex NSE1-NSE3-NSE4

Subkomplex NSE1-NSE3-NSE4 váže dvouvláknovou DNA a působí jako vazebná platforma pro globulární domény SMC5 a SMC6 podjednotek (Díaz *et al.*, 2019). NSE1 a NSE3 obsahují tandemové WINGED HELIX domény schopné asociace prostřednictvím homo a heterodimerizace. Kromě toho tvoří subkomplex s NSE4 kleisinovou podjednotkou (Palecek *et al.*, 2006), díky čemuž se tyto podjednotky označují jako KITE proteiny (kleisin interacting tandem winged helix element) (Palecek *et Gruber*, 2015). NSE4 podjednotka přemostňuje globulární domény SMC5/6 komplexu (Palecek *et al.*, 2006) a reguluje vazebnou aktivitu komplexu k DNA (Aragón, 2018). NSE1 podjednotka obsahující RING doménu pak hraje zásadní roli při sestavování trimeru NSE1-3-4, její mutace způsobuje přecitlivělost organismu na DNA poškození. Delece NSE1 je u *S. cerevisiae*, *S. pombe* i *A. thaliana* letální (Li *et al.*, 2017, Fujioka *et al.*, 2002).

Subkomplex NSE5-NSE6

Dalšími komponentami komplexu jsou *NSE5* a *NSE6* geny vykazující napříč druhy menší konzervovanost na úrovni sekvence ve srovnání s jinými podjednotkami SMC5/6 komplexu. Například u dělicích se kvasinek nejsou tyto geny životně důležité, naproti tomu u jiných organismů ano. Subkomplex NSE5-NSE6 vykazuje variabilitu ve svém umístění v holokomplexu, kdy se může nacházet buď na pantových nebo na globulárních doménách (Aragón, 2018).

Nejlépe popsáný je tento subkomplex u lidí. NSE5 a NSE6 podjednotky jsou spojeny s jádrem komplexu SMC5/6 a rekrutují jej do míst, kde došlo k poškození DNA a je vyžadována jejich oprava. Lidské podjednotky NSE5 a NSE6 (známé jako SLF1 a SLF2) fyzicky spojují RAD18 opravný faktor s SMC5/6 komplexem (Raschle *et al.*, 2015). Je také zajímavé, že lidská podjednotka NSE6 váže jak SMC5, tak i SMC6 protein, což naznačuje, že může blokovat ramena komplexu a regulovat tak dynamiku lidského komplexu SMC5/6. NSE6 podjednotka obsahuje doménu podobnou TOPO2 a nese C-koncovou doménu FAM, jež je konzervována u všech vyšších eukaryot. NSE5 podjednotka pak obsahuje tandemové N-terminální BRCT domény a úsek repetitivní na svém C-konci. Výzkumy odhalily, že se NSE6 doména FAM váže na NSE5 podjednotku, která interaguje pouze s NSE6 proteinem a nikoli s SMC jádrem. Interakční místo pro NSE6 podjednotku na SMC jádře komplexu leží v úseku SMC5 ramene mezi globulární doménou a vazebným místem pro NSE2. Za vazbu na SMC5/6 komplex je zodpovědná doména podobná TOPO2 (Adamus *et al.*, 2020).

3.3.3.1 SMC5/6 komplex u rostlin

Stejně jako u živočichů, je i u rostlin SMC5/6 komplex zapojen v regulaci celé řady procesů. (Diaz *et Pecinka*, 2018), kdy se jedná zejména o vývoj meristémů a semen (Ishida *et al.*, 2009), dobu kvetení (Kwak *et al.*, 2016), vývoj gametofytu (Liu *et al.*, 2014), a je také nutný pro efektivní opravu poškozené DNA prostřednictvím intramolekulární homologní rekombinace v somatických buňkách (Watanabe *et al.*, 2009). SMC5/6 komplex rostlin zahrnuje šest evolučně konzervovaných³ a dvě rostlinně-specifické podjednotky, ASAP1 a SNI1, jež jsou navrženy jako ortology k NSE5 a NSE6 podjednotkám (Yan *et al.*, 2013).

SMC6A a SMC6B podjednotky

Většina podjednotek je u existujících rostlinných druhů zastoupena genem s jedinou kopií, výjimkou je gen *SMC6* reprezentovaný *SMC6A* a *SMC6B* homology (Losada, 2005). Pro raná vývojová stádia rostlin, jako jsou sazenice či pupeny je hlavní exprimovanou složkou komplexu *SMC6B* protein (Watanabe *et al.*, 2009). Pokud je gen pro tento protein mutován, rostliny jsou přecitlivělé na DNA poškozující látky. Po vystavení rostlin těmto činidlům dochází k opoždění oprav DNA zlomů a snižuje se i frekvence homologní rekombinace. Snížení frekvence homologní rekombinace bylo však pozorováno nejen u *smc6b* mutantů, ale také při mutacích v genu *SMC6A* (Watanabe *et al.*, 2009). Oproti *smc6b* mutantům jsou mutanti *smc6a* životaschopní i při vážném poškození DNA. Dvojitá mutace *smc6a smc6b* je však embryonálně letální (Yan *et al.*, 2013). Oba homology *SMC6* genu jsou tedy zapojeny do DNA oprav, avšak *SMC6B* hraje v komplexu zásadní úlohu (Watanabe *et al.*, 2009). Celý SMC5/6 komplex pak funguje jako pozitivní regulátor HR v regulační síti, kde několik drah soutěží o zpracování lézí různými opravnými mechanismy (přehledně zpracováno v Diaz *et Pecinka*, 2018).

³ Evolučně konzervované podjednotky jsou SMC5, SMC6, NSE1, NSE2, NSE3 a NSE4 (Diaz *et Pecinka*, 2018).

NSE2/MMS21 podjednotka

Dalším důležitým rostlinným genem zapojeným v SMC5/6 komplexu je *NSE2/MMS21*. Mutanti *nse2/mms21* byli identifikováni u *A. thaliana* na základě krátkých kořenů se zvýšenou jadernou endoploidií (proto jsou označovány jako HIGH PLOIDY 2, HPY2), abnormálně vyvinutými semenáčky s malými listy, nepravidelnou fylotaxií, občasnými fasciemi a částečnou sterilitou. Buňky v kořenových apikálních meristémeh vykazovaly špatnou organizaci, a také zvýšenou frekvenci buněčné smrti. Molekulární a genetické studie u *A. thaliana* odhalily, že *NSE2/MMS21* podporuje přechody G1/S a G2/M destabilizací komplexu transkripčních faktorů E2FA/DPA a podporou cyklinu B1 (Ishida *et al.*, 2009). HPY2 podjednotka působí také jako supresoru kvetení. U *A. thaliana* je kvetení částečně regulováno transkripčním faktorem nacházejícím se ve flowering lokusu C (FLC). FLC je klíčovým regulátorem vernalizace a indukce kvetení po vystavení dlouhodobému chladu. Tento faktor je zřejmě stabilizován sumoylací pomocí HPY2 podjednotky. Pokud však dojde ke ztrátě podjednotky, dochází ke snížení množství FLC proteinu, čímž se kvetení urychluje (Kwak *et al.*, 2016).

NSE4 podjednotka

Další částí komplexu, jež je u rostlin dobře charakterizována, je *NSE4* protein, zastoupen u *A. thaliana* homology *NSE4A* a *NSE4B*. *NSE4A* protein je exprimován v meristémeh a hromadí se během opravy poškození DNA. Částečná ztráta *NSE4A* funkce není letální, ale vede ke vzniku přecitlivělosti na poškození DNA vyvolané zebularinem. Mutanti *nse4a* navíc produkují abnormální semena s nebuněčným endospermem a embryemi. Tento fenotyp poukazuje na roli SMC komplexu při diferenciaci během vývoje semen. Exprese *NSE4A* je nezbytná během sporogeneze, gametogeneze, embryogeneze a vývoji endospermu, což ukazuje nezbytnost tohoto proteinu pro reprodukční vývoj u *Arabidopsis*. *NSE4B* protein je exprimován pouze v několika typech buněk a mutanti se ztrátou funkce nemají žádný zjevný abnormální fenotyp. Funkce *NSE4B* zůstává necharakterizovaná (Díaz *et al.*, 2019).

3.4 Helikázy

Helikázy jsou motorové proteiny katalyzující především rozvíjení dvouvláknové DNA pomocí energie získané hydrolýzou ATP (Knoll *et Puchta*, 2011). Všechny helicázy sdílejí některé běžné vlastnosti jako je vazba nukleových kyselin, vazba NTPs, hydrolytická aktivita a odvíjení duplexní DNA ve směru 3'-5' nebo 5'-3'. Díky tomu jsou tyto enzymy nepostradatelné pro základní procesy týkající se zpracování genetické informace, kdy do těchto procesů zahrnujeme replikaci, transkripci, opravy DNA a rekombinaci. Aktivitou v těchto procesech se helicázy podílejí na zabezpečení stability genomu (Tuteja, 2003).

Úlohy helicáz u prokaryot a eukaryot se liší, a to zejména díky zvyšující se složitosti genomu. Avšak i přes tuto skutečnost existuje určitá funkční a genetická shoda v ochraně stability genomu zprostředkované touto skupinou enzymů. U různých říší můžeme najít jednotlivé ortology stejného druhu helicáz, které se však liší individuálním číslem a přesnými funkcemi (Dorn *et Puchta*, 2019). Jednou z hlavních skupin jsou RECQ helicázy patřící do podrodiny 3'-5' helicáz konzervovaných

napříč všemi živými doménami (Knoll *et Puchta*, 2011). Další významnou skupinou jsou poté helikázy obsahující ve svém jádře vazebnou doménu Fe-S klastru. Řadí se zde XPD, CHL1, FANCI a RTEL1 helikázy, jejichž mutace jsou spojeny s vážnými dědičnými chorobami (Suhasini *et Brosh*, 2013).

U rostlin bylo identifikováno několik různých skupin helikáz (Dorn *et Puchta*, 2019), které jsou zapojeny do širšího spektra procesů, do něhož je zahrnuta DNA rekombinace, replikace DNA, iniciace translace, transkripce rDNA, zpracování pre-RNA, opravy dvouřetězcových zlomů, udržování délky telomer, nukleotidová excizní oprava, proliferace buněk během vývoje květu, udržování genomických metylačních spekter a buněčný cyklus (Tuteja, 2003). Důležité je také uvést, že v rostlinách byly identifikovány homology všech výše uvedených helikáz (Dorn *et Puchta*, 2019), kdy se podrobněji zaměřím na helikázu RTEL1, která je předmětem této diplomové práce.

3.4.1 RecQ

Jednou z hlavních skupin jsou helikázy RECQ, které zabraňují nevratnému zhroucení poškozených replikačních vidlic a potlačují určité formy genetické rekombinace, čímž udržují rovnováhu mezi replikací DNA a její rekombinací. Tyto enzymy byly identifikovány ve všech živých organismech, kdy většina jednobuněčných organismů obsahuje pouze jeden gen pro RECQ helikázu, zatímco mnohobuněčné organismy mají většinou dva a více geny (Chu *et Hickson*, 2009). Jedná se o enzymy rozlišující různé DNA rekombinogenní struktury ve směru 3'-5' a hrají hlavní roli v řadě opravných a rekombinačních procesů (Hartung *et Puchta*, 2006). V rostlinách lze nalézt až sedm různých genů pro RECQ helikázy a *Arabidopsis thaliana* obsahuje šest z nich. RECQ1, RECQ2, RECQ3 a RECQ5 jsou malé proteiny o velikosti 600-700 aminokyselin, zatímco RECQ4A a RECQ4B jsou složeny z více jak 1100 aminokyselin (Knoll *et Puchta*, 2011).

Nejvíce popsaným enzymem této rodiny je RECQ4A, jenž je funkčním homologem dobře prozkoumaného enzymu SGS1 u kvasinek, nebo dobře známého lidského BLM proteinu (Bagherieh-Najjar, 2003). U rostlin byly popsány dva interakční partnery RECQ4A, RMI1 a TOP 3 α (tzv. RTR komplex), nezbytné pro meiotickou rekombinaci u rostlin, kde hrají ústřední roli v rozkládání rekombinačních meziproductů. Po vyřazení více *RECQ* genů dochází u rostlin ke vzniku hyper-rekombinačních fenotypů a meiotických defektů, a také k přecitlivělosti k různým typům poškození DNA (Knoll *et Puchta*, 2011). Při souběžné ztrátě RECQ4 a RTEL1 helikázy buňky nejsou schopny odstranit toxické rekombinační meziproducty, což vede ke vzniku drastických vývojových vad vedoucích ke tvorbě degenerovaných kořenů, fasciováných výhonků a snížené velikosti dospělých rostlin, které jsou sterilní (Recker *et al.*, 2014).

3.4.2 FANCI

Lidská helikáza FANCI je členem dráhy Fanconiho anémie zodpovědné za opravu ICL. Mutace v genech FA vede k dědičnému onemocnění charakterizovanému vrozenými vadami, selháním kostní dřeně a predispozicí k rakovině (Kim *et D'Andrea*, 2012). U *Arabidopsis thaliana* je tato helikáza reprezentována duplikovaným genovým párem v podobě FANCIJA a FANCIJB proteinů. Tyto proteiny mezi sebou vykazují vysokou podobnost a homologii s lidskou helikázou FANCI, avšak pouze FANCIJB

se jeví funkčním homologem lidské verze proteinu, jelikož bylo možné určit jeho funkci při opravách ICL poškození (Dorn *et al.*, 2019).

FANCJB na rozdíl od Fe-S klastrové helikázy RTEL1 neplní žádnou roli při potlačení HR, avšak jejich vzájemná genetická interakce má zvláštní význam. Analýzou meristému v kořenech byla prokázána jejich nezávislá role při opravách spojených s replikací. Nejpozoruhodnějším pozorováním byla redukce 45S repetice na jednu třetinu z původního počtu u dvojíých mutantů *rte11-1 fancjb-1*. Tato nestabilita vzniká zřejmě v důsledku zapojení obou proteinů do odvíjení G-kvadruplexů, které se mohou tvořit v sekvencích bohatých na guanin, kdy příkladem takovýchto sekvencí je právě rDNA. Pokud dojde ke ztrátě RTEL1 i FANCJB najednou, mohou se G4 struktury v rDNA lokusu akumulovat, což způsobí blokaci replikace a nakonec ztrátu sekvencí (Dorn *et al.*, 2019).

3.4.3 RTEL1

RTEL1 neboli regulátor helikázy 1 pro prodloužení telomer („Regulator of Telomere Elongation Helicase1“) hraje zásadní roli v udržování stability genomu, a to hned několika způsoby (Uringa *et al.*, 2011). RTEL1 funguje jako antirekombináza působící proti HR rozebíráním D-smyček (Barber *et al.*, 2008), účastní se oprav poškozené DNA například při blokaci replikačních vidlic, a také přispívá k homeostáze telomer rozkládáním T smyček, G4 struktur a struktur s nimi spojenými. U lidí vedou mutace v *RTEL1* k Hoyeraal-Hreidarssonovu syndromu (Deng *et al.*, 2013), což je závažná forma dyskeratózy⁴ (Vannier *et al.*, 2014).

RTEL1, spolu s komplexem nukleoproteinových enzymů zvaných telomeráza, také napomáhá efektivní údržbě telomer (Uringa *et al.*, 2011). U živočichů dochází k diferenciaci tkání a umlčování telomerázy během raného embryonálního vývoje. U rostlin probíhá růst a ontogeneze prostřednictvím sériového dělení apikálních meristémů sestávajících z malé skupiny kmenových buněk, které generují lineární sérii buněk, jež se dále diferencují a k umlčování telomerázy tak nedochází (Procházková Schrupfová *et al.*, 2019). RTEL1 udržuje homeostázu telomer pomocí otevírání T-smyček pro replikaci a transkripci zejména v somatických buňkách. Kromě toho může RTEL1 bránit invazi 3' konce ssDNA telomery do sekvencí telomer jiných chromozomů, čímž může zamezit rekombinaci telomer, propletení chromozomů a jejich následnému rozbití při segregaci během mitózy (Uringa *et al.*, 2011). RTEL1 helikáza může omezit zkracování telomer i díky sekvenci podobnosti s helikázou FANCJ, díky čemuž může být vyžadována k rozlišení struktur G-kvadruplexů (London *et al.*, 2008), jež jsou v telomerách přirozeně přítomny (Ding *et al.*, 2004).

⁴ Jedná se o vrozenou predispozici k selhání kostní dřevě a vzniku rakoviny, kdy je toto onemocnění charakterizováno krátkými telomery a nestabilitou genomu (Vannier *et al.*, 2014).

3.4.3.1 RTEL1 u rostlin

Homolog RTEL1 se vyskytuje u *Arabidopsis thaliana* i u dalších rostlin. Gen *RTEL1* má délku 5958 bp a zahrnuje 21 exonů a 20 intronů, předpokládaný protein má délku 1040 aminokyselin a obsahuje bipartitní helikázovou doménu zahrnující DEAD_2 motiv v blízkosti N-konce a Helicase_C_2 motif poblíž C-konce. U rostlin se RTEL1 podílí na zachování stability genomu několika cestami a v zásadě lze všechny jeho rozmanité role vysvětlit schopností helikázy rozebrat rekombinační meziprodukty podobné D-smyčce (Recker *et al.*, 2014).

Funkční helikáza RTEL1 je nezbytná pro správný vývoj rostlin. U *rtell-1* mutantní linie byl v kořenovém meristému pozorován zvýšený počet mrtvých kmenových buněk a docházelo k přeskupení kořenového meristému. Ztráta synchronizovaného dělení buněk vedla k narušení architektury kořenového meristému (Recker *et al.*, 2014), což způsobilo snížení velikosti kořenového i kortikálního meristému oproti wild type rostlinám. U mutantních rostlin se projevoval inhibiční účinek na růst kořenů zkrácením primárního kořene. Tato linie navíc vykazovala retardaci i v růstu mladých listů a vykazovala menší velikost celé rostliny oproti wild type rostlinám. Buněčnou analýzou bylo prokázáno, že zmenšený růst listů byl zapříčiněn snížením počtu buněk, jejich kompenzačním zvětšením a také zvýšením endoreplikace DNA. Nedostatek RTEL1 proteinu tedy zpomaluje růst rostlin, v jejich fenotypu se projevuje prodloužení S fáze a snížená buněčná proliferace (Hu *et al.*, 2015).

RTEL1 se na udržování genomové stability podílí také opravami IL a ICL (Procházková Schrupfová *et al.*, 2019). Genetická analýza odhalila, že *rtell-1* mutantní rostliny vykazují aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu a specifickou citlivost na činidla vytvářející crosslinky v DNA (Hu *et al.*, 2015). Udržování genomové stability pomocí DNA oprav řídí v genomu rostlin několik prominentních faktorů. Jsou to zejména antirekombináza RECQ4A, nukleáza MUS81, a také RTEL1 helikáza. Tyto enzymy definovaly různé cesty vedoucí k opravě poškozené DNA (Mannuss *et al.*, 2010).

Hlavní opravnou dráhou s níž je svázána RTEL1 helikáza je homologní rekombinace, která musí být přísně regulována a časově koordinována s progresí buněčného cyklu (Krogh *et al.*, 2004). Analýzou reportérových linií bylo prokázáno, že má *rtell-1* mutantní linie ve srovnání s rostlinami s funkčním genem zvýšenou frekvenci rekombinace (Recker *et al.*, 2014). RTEL1 je také paralelně s RTR komplexem zapojen do udržování repetitivních sekvencí. Tento komplex u rostlin taktéž potlačuje homologní rekombinaci a je složen z RECQ4A helikázy, topoizomerázy 3 α a RMI1 a 2 faktoru. RMI2 faktor hraje hlavní úlohu v opravách aberantních replikačních meziproduktů v kořenových meristémech a podílí se i na opravách intrastrandových vazeb. Genetická analýza prokázala další zvýšení frekvence rekombinace u dvojitě mutantních rostlin, společně se silnou destabilizací rDNA sekvencí, což je škodlivé právě pro vysoce se dělící tkáň, což pravděpodobně vedlo k částečné sterilitě (Röhrig *et al.*, 2016).

Kromě výše zmíněných oprav se RTEL1 podílí i na stabilitě a homeostáze telomer. Genetická analýza prokázala vztah mezi RTEL1 a TERT v zachování délky telomer. U dvojitých mutantů docházelo k zastavení vývoje po čtyřech generacích (Recker *et al.*, 2014) ve srovnání s deseti

generacemi u jednoduchých mutantních *tert* rostlin (Riha, 2001). U dvojitých mutantů navíc docházelo ke vzniku závažných vývojových vad, jako jsou aberantní výhonky, špatná morfologie listů a docházelo také ke značnému zmenšení celých rostlin oproti kontrolním rostlinám (Recker *et al.*, 2014). Toto pozorování naznačuje roli RTEL1 v alternativním prodlužování telomer (ALT), čímž částečně kompenzuje ztrátu TERT (Růčková *et al.*, 2008). Následně bylo prokázáno, že se na ALT u *A. thaliana* podílí homologní rekombinace závislá na RAD51 faktoru (Olivier *et al.*, 2018), který je závislý na RTEL1 helikáze, jež je nutná pro rozklad D-smyček při replikaci telomer (Kamisugi *et al.*, 2016). Závěrem lze říci, že se RTEL1 a TERT podílejí na zachování délky telomer a stability rostlinného genomu (Procházková Schrupfová *et al.*, 2019).

4 MATERIÁLY A METODY

Experimentální část práce zahrnuje identifikaci nových proteinů zapojených v opravách DNA-proteinových crosslinků pomocí kandidátních rostlin z dopředného genetického screenu (DPCR, „DNA-protein crosslink repair“ screen). EMS mutagenizované rostliny byly testovány na senzitivitu k zebularinu, což je DNA-protein crosslinkující činidlo. Populace byla osekvenována pro identifikaci potencionálních kauzálních mutací a kauzální mutace byly následně potvrzeny dle schématu níže:

- Selektce homozygotních T-DNA mutantů pro kandidátní geny z DPCR screenu
- Validace T-DNA mutantů na zebularinu
- Komplementační křížení s EMS mutanty pro potvrzení kauzální mutace
- Ověření mutace u EMS mutantů Sangerovým sekvenováním
- Potvrzení fenotypu identifikovaných kandidátů a EMS mutantních rostlin

Dále zahrnuje genetickou analýzu pomocí reverzního genetického screenu pro identifikaci DNA opravných drah, ve kterých je kandidát zapojen:

- Křížení příslušných T-DNA mutantních rostlin pro získání dvojitéch mutantů
- Selektce homozygotních mutantů pro oba kandidátní geny
- Analýza fenotypu
 - Analýza buněčné smrti – barvení propidium jodidem
 - Analýza replikační aktivity v kořenech – měření diferenciální zóny
 - Efekt mutace na fenotyp rostlin
 - Senzitivita k různým genotoxickým látkám

4.1 Biologický materiál

Pro tyto experimenty byly použity:

- Rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), různé linie, viz Tabulka 2

Tabulka 2: Seznam rostlinných linií. V tabulce jsou uvedeny AGI čísla jednotlivých genů, informace o T-DNA liniích k příslušným genům a názvy primerů použitých k PCR genotypování – amplifikace genu (Gen) a T-DNA inzertu (Inzert).

	AGI nr.	Mutantní alela	Gen		Inzert	
			Forward	Reverse	Forward	Reverse
SMC6B	At5g61460	<i>smc6b-1</i> , SALK_101968C	ET0035	ET0036	ET0035	LB_AP1
NSE4A	At1g51130	<i>nse4a-2</i> , GK- 768H08	nse4a-2_F	nse4a2_R	nse4a-2_F	o84748-m
HPY2-2	At3g15150	<i>mms21-2</i> , SAIL_77_G06	HPY-2_F	HPY-2_R	SAIL_LB2m	MMS21-2_R
RTEL1	At1g79950	<i>rtel1-1</i> , SALK_113285 C	gRTEL2-F	gRTEL2-R	gRTEL2-F	LB_AP1
W35		Wild type	-	-	-	-

Podmínky kultivace rostlin byly různé v závislosti na fázi experimentu. Po vysazení sterilních semen na misky s živným médiem ½ Murashige a Skoog byly misky umístěny do inkubátoru Percival na 7 dní. Následně měly rostliny dostatečně vyvinutý kořen na to, aby je bylo možné umístit do substrátu který byl ošetřen přípravkem Careo a smíchan s perlitem v poměru 1:3. Rostliny byly poté umístěny buďto do fytotronové komory nebo do skleníku. Růstové podmínky pro jednotlivá zařízení jsou definována v Tabulce 3:

Tabulka 3: Podmínky kultivace rostlin.

Zařízení	Typ rostlin	Podmínky	
		Den	Noc
Fytotronová komora	Vysetá semena na miskách s živným médiem, rostliny umístěné v zemině většinou do stáří 1 měsíce	16 hod, 19 °C, vlhkost 65 %	8 hod, 18 °C, vlhkost 65 %
Inkubátor Percival	Semena vysetá na miskách s živným médiem, většinou do stáří 14 dnů	16 hod, 21 °C	8 hod, 18 °C
Skleník	Rostliny umístěné v zemině starší než 1 měsíc	16 hod, 24 °C	8 hod, 16 °C

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza (Top-Bio, kat. č. P045)
- Bleomycin (Sigma-Aldrich, kat. č. 203408M)
- Dexrazoxane (ICRF-187) (Sigma-Aldrich, kat. č. D1446)
- Camptothecin (CPT) (Sigma-Aldrich, kat. č. C9911)
- DNA loading dye 6× (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R0611)
- Dream Taq™ Green PCR Master Mix, (Thermo Fischer scientific, kat. č. K1081)
- DMSO (dimethyl sulfoxid) (Serva, kat. č. 39757)
- EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134)
- Ethidium bromid (Top-Bio, kat. č. P047)
- Isopropanol 99% p.a. (Lach-ner, kat. č. 20037-AT0)
- Marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM1333)
- Propidium iodid (Sigma-Aldrich kat. č. P4170)
- Sterilní H₂O
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P9416)

- Zebularin $10 \mu\text{mol} \times 10^{-3}$ v DMSO (Sigma-Aldrich, kat. č. Z4775)
- Mitomycin C (MMC) (Sigma-Aldrich, kat. č. M4287)
- 96% ethanol (Lach-ner, kat. č. 20025-A96)

Použité soupravy

- DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, kat.č. 69106)
- ExoSAP-IT PCR purifikační set (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 75001.40.UL)
- GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K0832)
- NucleoSpin[®] Plant II kit (Biotech, kat.č. 740770.10)
- Phusion High-Fidelity DNA Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. F553S)
- Platinum[™] Pfx DNA Polymerase, invitrogen (Kat. č. 11708-013)
- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K1632)
- RNase-Free DNase Set 1500 Kunitz units (Qiagen, kat. č. 79254)
- RNase[®] Plant Mini Kits (Qiagen, kat. č. 74904)

Použité roztoky a jejich příprava

- Hypochlorid sodný 8%: Smíchat 7 ml 12% NaClO s 3 ml destilované vody. Automatickou pipetou přidat 100 μl 20% detergentu Tween20.
- Agarózový gel pro elektroforézu: Navážit 1 g agarózy, přidat ji ke 100 ml TAE pufru a nechat ji rozvařit v mikrovlnné troubě, dokud nebude roztok čirý. Nechat mírně vychladnou a přidat 1 μl ethidium bromidu na 100 ml roztoku. Roztok promíchat a vlít do elektroforetické komory.
- 1% agaróza pro natahování kořenů a fotodokumentaci: Navážit 3 g agarózy, přidat ji ke 300 ml destilované vody a rozehrát ji v mikrovlnné troubě dokud nebude roztok čirý. Na misku vždy vylít 10 ml roztoku a nechat jej zatuhnout.
- Edwardsův pufr: Smíchat 20 ml 1M Tris (pH 7.5 nebo 8), 5 ml 5M roztoku NaCl, 5 ml 0,5M EDTA, 5 ml 10% SDS a nakonec přidat 65 ml destilované vody.
- ½ Murashige a Skoog médium (pH 5,8) s 0,6 a 0,8% agarem: Smíchat 22 g MS soli, 10 g sacharózy, 1 g MES a 6 nebo 8 g agaru. Doplnit do objemu 1 l destilovanou vodou a upravit pH na 5,8 pomocí KOH. Roztok nechat vyautoklávovat.
- 1× TAE pufr: Nalít 20 ml 50× TAE pufru do nádoby a doplnit objem destilovanou vodou do 1000 ml.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Přístroje a zařízení

- Analytické váhy Scout SC4010 (Ohaus)
- Analytické váhy (Sartorius)
- Automatické pipety BioPette^{PLUS} (LabNet)
- Automatická třepačka Digit (VWR)

- Centrifuga MicroStar 17R (VWR)
- Centrifuga MiniStar Silverline (VWR)
- Centrifuga Multifuge X1R (ThermoScientific)
- Centrifuga myFuge Mini (Benchmark Scientific)
- Centrifugačním evaporátor (SPD1010)
- Elektroforetická vana se zdrojem napětí (Bio-Tech)
- Fytotronová komora (Wiss Gallenkamp)
- Fotoaparát Nikon, AF-S Micro (Nikon)
- Hlubokomrazicí box JOUAN (Trigon-Plus)
- Laboratorní digestoř M 1800 (Merci 1800)
- Laminární box MCS 1.2 Advantage (Thermo Fischer Scientific)
- Laminární box JOUAN (Trigon-Plus)
- Mikroskop DSD2 (Andor)
- Mikroskop konfokální (Leica 265 Microsystems)
- Mikrovlnná trouba EMN (Zanusii 2015)
- Nanodrop OneMicrovolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)
- Percival inkubátor (Percival)
- Souprava pro horizontální gelovou elektroforézu (Bio-Rad)
- Termostatovaná třepačka MaxQ 4000 (Thermo Fisher Scientific)
- Tissue lyser MM301 (Retch)
- Transluminátor InGenius LHR (Trigon-Plus)
- Thermocycler T-Gradient (Biometra)
- Thermomixér THERMAL (VWR)
- Vortex MiniStar (VWR)
- Vortex DIGIT (VWR)
- Výrobník ledu (Brema)

Použité programy

- Adobe Photoshop CS5 (64 Bit)
- Ilustrátor obrázku Andor iQ3 (ANDOR)
- Image J pro zpracování snímků (Java)
- ND-1000 V3.8.1 (Thermo Fisher Scientific)
- SnapGene V5.2.4 (GSL Biotech LLC)
- Statistický program ANOVA (STATISTICA)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Sterilizace semen

4.4.1.1 V ethanolovém gradientu

Semena byla vysterilizována v ethanolovém gradientu. Ve sterilním boxu byl přidán k semenům ve zkumavce 1 ml 70% ethanolu a inkubace probíhala 10 minut na třepačce. Poté byl roztok vyměněn za 1 ml 96% ethanolu a inkubace probíhala 5 minut na třepačce. Veškerý obsah ethanolu byl odsát a semena byla sušena v mikrozkuhavce umístěné v laminárním boxu. Následně byla semena vyseta na 25ml Petriho misky s živným médiem Murashige a Skoog (MS) a byla uložena do fytotronové komory.

4.4.1.2 Pro kontrolovaný výsev

Ve sterilním boxu byl do mikrozkuhavky se semeny přidán 70% ethanol a inkubace probíhala 5 minut na třepačce. Poté byl ethanol odstraněn a k semenům byl přidán 8% hypochlorid sodný s 0,01% tweenem 20, inkubace probíhala 6 minut na třepačce. Hypochlorid byl následně odstraněn a proběhla tři kola promývání sterilní vodou, kdy jedna inkubace na třepačce trvala 5 minut. Po posledním promytí byla k semenům přidána 0,1% agaróza. Takto nachystaná semena byla stratifikována při 4°C po dobu dvou dní a následně byla vyseta pipetou pomocí sestřižené špičky na 50ml Petriho misky s růstovým ½ MS médiem s 0,6% agarem. Misky s vyšetými semeny byly umístěny do fytotronu.

4.4.2 Izolace DNA

Pro izolaci vysoce kvalitní DNA byly použity komerční kity DNeasy[®] Plant Mini Kit (50), Qiagen, (viz návod od výrobce) a NucleoSpin[®] Plant II kit, (viz návod od výrobce). Pro izolaci DNA z velkého množství rostlin pro genotypování byla použita následující metoda izolace DNA.

Z každé rostliny byl odstrižen kousek lístku či celý lístek. Rostlinný materiál byl postupně umístěn do předem popsanych zkumavek s kuličkami. Po uzavření zkumavek byly vzorky zmrazeny tekutým dusíkem a homogenizovány v Tissue lyseru dvakrát po dobu 60 sekund. Následně bylo ke vzorkům přidáno 100 µl Edwardsova pufru, vzorky byly vortexovány a centrifugovány při 2250 g po dobu 20 minut. Do čistých zkumavek bylo napipetováno 80 µl supernatantu a bylo k němu přidáno 80 µl isopropanolu pro precipitaci DNA. Vzorky byly opět vortexovány a centrifugovány při 2250 g po dobu 10 minut. Po centrifugaci vzorků byl supernatant odstraněn vyklepnutím, do zkumavek bylo pro promytí peletu napipetováno 80 µl 70% ethanolu a vzorky byly opět centrifugovány při 2250 g po dobu 10 minut. Supernatant byl opět vyklepnutím odstraněn a vzorky se nechaly vysušit v termostatu dnem vzhůru po dobu 60 minut. Nakonec bylo ke vzorkům přidáno 50 µl TE pufru, ve kterém byly inkubovány přes noc při 4°C. Po inkubaci byly vortexovány a 1 µl takto vyizolované DNA byl použit jako templát do PCR reakce.

4.4.3 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byl použit RNase[®] Plant Mini Kit (50), Qiagen, postup viz návod od výrobce.

4.4.4 cDNA syntéza

Před syntézou cDNA byla vždy změřena koncentrace a čistota vyizolované RNA pomocí spektrofotometru Nanodrop. Poté byla připravena reakční směs pro cDNA syntézu dle počtu vzorků a byla provedena syntéza cDNA za stanovených podmínek, viz Tabulka 4, kdy v první části probíhá specifická denaturace templátu a v následující části probíhá samotná syntéza cDNA.

Tabulka 4: Složení reakční směsi a průběh reakce pro cDNA syntézu.

Reagencie	Objem na 1 reakci [μ l]	Průběh reakce
vzorek RNA	11	65 °C 5 minut
oligoDT primery	1	
5× reakční pufr	4	42 °C 60 minut 70 °C 5 minut
10mM dNTPs	2	
Ribolock RNase inhibitor	1	
reverzní transkriptáza	1	

4.4.5 PCR genotypování

Genotypování sloužilo k selekci T-DNA mutantních rostlin a bylo prováděno PCR reakcí zahrnující DreamTaq polymerázu od firmy Thermo Fisher. Byla připravena PCR směs dle počtu vzorků, viz Tabulka 5. Primery používané pro jednotlivé rostlinné linie jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 5: Reakční směs pro genotypování.

Reagencie	Objem na 1 reakci [μ l]
ddH ₂ O	12,9
10× Dream Taq pufr	2
2mM dNTPs	2
10 μ l primer forward	1
10 μ l primer reverse	1
Dream Taq polymeráza	0,1
DNA templát	1

Reakční směs byla napipetována do 96 jamkové PCR destičky a do každé jamky byl napipetován 1 μ l DNA templátu vyizolovaného metodou Edwardse, kdy amplifikace probíhala dle parametrů uvedených v Tabulce 7.

Tabulka 6: Oligonukleotidy použité pro amplifikaci jednotlivých lokusů. Sekvence uvedeny v Příloze 1.

Název T-DNA linie	Gen		Inzert	
	forward	reverse	forward	reverse
RTEL1	gRTEL2-F	gRTEL2-R	gRTEL2-F	LB_AP1
SMC6B	ET0035	ET0036	ET0035	LB_AP1
NSE4A	nse4a-2_F	nse4a-2_R	nse4a-2_F	o84748m
HPY2	HPY2-2_F	HPY2-2_R	SAIL_LB2m	MMS21-2_R
RTEL1 (1222 bp na gDNA)	ET0131	3_13 uniR1		
RTEL1 (685 bp na gDNA)	ET0151	3_13 uniR1		
RTEL1 (566 bp na cDNA)	ET0131	ET0152		

Tabulka 7: Průběh DNA amplifikace – genotypování.

Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	3 minuty	1
95 °C	30 sekund	35
55 °C	30 sekund	
72 °C	1 min/kb	
72 °C	10 minut	1
4 °C	∞	1

4.4.6 Elektroforetická separace

Vzorky byly separovány na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium bromidu. Po separaci byl gen vizualizován na UV transluminátoru.

4.4.7 Selekcce homozygotních mutantů pro kandidátní gen *zes3-13*

Pro validaci kauzálních mutací u jednotlivých EMS mutantních linií byla vybrána T-DNA linie s mutací v predikovaném kauzálním genu. Tento gen byl vybrán na základě frekvence mutace v mapovací populaci a efektu dané mutace na funkci genu. V databázi NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center) byla objednána semena T-DNA linie (*dpcr2*) odpovídající mutaci v kandidátním genu *zes 3-13*. Selekcce homozygotních mutantů probíhala dle následujícího postupu:

Byly navrženy a objednány specifické primery pro genotypování T-DNA mutantní linie. Semena byla odsypána do čistých 1,5ml mikrokumavek, byla vysterilizována metodou sterilizace v ethanolovém gradientu a vyseta na ½ MS růstové médium s 0,6% agarem. Po 7 dnech růstu byly rostliny přesazeny do substrátu a umístěny do skleníku. Z každé rostliny byl odstrižen kousek lístku či celý lístek pro izolaci DNA metodou Edwardse. Následně bylo provedeno genotypování mutantní linie pomocí primerů specifických pro amplifikaci T-DNA inzertu a wilt type alely daného genu. Po amplifikaci byly vzorky nanoseny na 1% gel a rozděleny podle své elektroforetické mobility. Pro orientační určení molekulové hmotnosti jednotlivých spotů byl na gel nanesen také 1 kb Plus Ladder. Pomocí UV transluminátoru byl vizualizován elektroforetogram, který byl vyhodnocen.

4.4.7.1 Validace kandidátních genů

Po selekci homozygotních rostlin, tedy obsahujících inzert a neobsahujících původní gen, se kandidáti ověřovali na médiu se zebularinem – činidlem tvořícím DNA-proteinové crosslinky. Opravdoví kandidáti vykazovali zvýšenou senzitivitu na zebularin, kdy byla použita pozitivní kontrola v podobě *smc6b-1* rostlin, které jsou vysoce senzitivní na tuto chemikálii, a také negativní kontrola W35, jež je vůči zebularinu rezistentní. Zvýšená senzitivita v tomto případě představuje zkrácení kořenů rostliny oproti negativní kontrole.

Byla vysazena semena jak identifikovaných kandidátů z T-DNA linií, tak i EMS mutantních rostlin, a také kontroly (pozitivní – citlivá kontrola *smc6b-1* a negativní – rezistentní kontrola W35) na 50 ml ½ MS s 0,6% agarem bez chemikálií a na 50 ml ½ MS s 0,6% agarem s přidavkem 20µM zebularinu a sledovalo případné zkrácení kořenů.

4.4.7.2 Komplementační křížení

Po potvrzení senzitivity bylo provedeno křížení mutantních rostlin s kandidátními rostlinami. Mutace ležící v tomtéž genu způsobí, že budou všechny rostliny z křížení senzitivní na zebularin, pokud ale mutace leží v jiném genu, rostliny budou rezistentní. Po křížení kandidátní rostliny s EMS mutantní rostlinou bylo sledováno zkrácení kořenů u M1 generace na médiu se zebularinem v porovnání s kontrolami.

4.4.7.3 Ověření mutace Sangerovým sekvenováním

Pro ověření mutace v dané kandidátní EMS linii bylo provedeno Sangerovo sekvenování. Jako první byla vyzolována DNA z kandidátních EMS mutantů a z kontrolní rostliny. Rostlinný materiál byl vložen do 1,5ml mikrozkušavek s kuličkami, byl zmrazen tekutým dusíkem a byl homogenizován na Tissue Lyseru dvakrát po dobu 60 sekund. DNA byla vyzolována NucleoSpin® Plant II kitem dle protokolu II. Byla změřena koncentrace DNA pomocí spektrofotometru Nanodrop a byla provedena amplifikace lokusu genomové DNA, který byl ověřen jako kandidátní pomocí specifických forward a reverse primerů. Po amplifikaci byly PCR produkty nanoseny na 1% gel a byly rozděleny podle své elektroforetické mobility. Pro orientační stanovení molekulové hmotnosti jednotlivých spotů byl na gel nanesen také 1 kb Plus DNA Ladder. Elektroforetogram byl vizualizován na UV spektrofotometru. Pokud bylo ve vzorku více produktů, pak se spoty odpovídající velikosti příslušnému lokusu vyřezaly z gelu, tyto vyřezané kousky gelu byly umístěny do čistých 1,5ml mikrozkušavek a vzorky byly extrahovány pomocí GeneJET extraction kitu. Pokud byl ve vzorku přítomen pouze jeden specifický produkt, byla purifikována přímo PCR reakční směs vzorku pomocí ExoSAP kitu. Byla opět změřena koncentrace DNA a v případě nízké koncentrace byly vzorky zakoncentrovány na centrifugačním evaporátoru. Nakonec byly vzorky připraveny pro sekvenování firmou SEQme. Dle koncentrace se vzorek naředil, viz Tabulka 8, tak aby po přidavku primeru (forward, nebo reverse) byl celkový objem 10 µl. Pro jeden produkt byly tedy odeslány vždy dva vzorky, jeden s forward primerem a druhý s reverse primerem.

Tabulka 8: Parametry pro sekvenování s vlastními primery.

Velikost templátu	Množství	Primery	Celkový objem
PCR produkt < 500 bp	50 ng	25 pmol (5 μ l nebo 5 μ mol \cdot dm ⁻³)	10 μ l
PCR produkt 500–1000 bp	100 ng		
PCR produkt > 1000 bp	200 ng		
Plasmid	500 ng		

Pro ověření efektu mutace na transkripci cílového lokusu, a tedy případný efekt na funkci proteinu byla vyizolována celková RNA z kandidátních EMS mutantů a z kontrolní rostliny pomocí RNeasy® Plant Mini kitu. RNA byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA. Poté byla cDNA amplifikována příslušnými primery pro daný lokus, produkty byly nanášeny na gel a byly elektroforeticky separovány. Poté byl vyhodnocen elektroforetogram a spot s odpovídající velikostí byl opět vyříznut a poslán na sekvenování. Nakonec byla provedena analýza dat ze sekvenování, kdy se sledovala změna genomové sekvence a sekvence transkriptu u EMS mutantní rostliny.

4.4.7.4 Analýza fenotypu identifikovaných kandidátů a EMS mutantních rostlin

Semena identifikovaných kandidátů (T-DNA linie), EMS mutantů (*zes3-13*) a kontrol (*smc6b-1*, a W35) byla vysterilizována metodou pro kontrolovaný výsev a byla vyseta na ½ MS živné médium s 0,6% agarem a s 20 μ M zebularinem a také na čisté ½ MS živné médium s 0,6% agarem. Sedmidenní rostliny byly poté přeneseny na misky s agarózou, kde byly vyskládány jedna vedle druhé, a to tak aby byly rostliny ve stejné výšce a měly natáhnuté kořeny. Poté byla miska vyfocena dnem vzhůru a v programu ImageJ byla změřena délka každého kořene. Sledovalo se zkrácení délky kořene po ovlivnění zebularinem v porovnání s kontrolou.

4.4.8 Analýza dvojitých mutantů

4.4.8.1 Selektce dvojitých mutantů

Křížením jednotlivých mutantů v kandidátních genech byly vytvořeny M1 populace mutantních rostlin: *rtell-1 smc6b-1*, *rtell-1 nse4a-2* a *rtell-1 hpy2-2*. Tato semena, která byla heterozygotní pro obě mutantní alely, byla přemnožena do M2 generace, jež představovala populaci segregující. Z této generace byly selektovány dvojitě homozygotní mutantní rostliny. Z těchto rostlin pak byla odebrána semena, jež byla vysterilizována v ethanolovém gradientu a byla vysazena na ½ MS médium s 0,6% agarem. Po 7 dnech byly rostliny přeneseny do substrátu a byl z nich odebrán materiál pro izolaci DNA pro následný genotyping za pomoci specifických primerů. Rostliny, jež byly pozitivní na přítomnost obou mutantních lokusů byly samosprášeny, a tím převedeny do další generace. Se semeny této populace se nadále pracovalo.

4.4.8.2 Analýza buněčné smrti

Semena dvojitých mutantů, jednoduchých mutantů a kontroly byla vysterilizována metodou kontrolovaného výsevu a následně vyseta na ½ MS s 0,8% agarem a umístěna do fytotronové komory, kde byly kultivovány ve vertikální poloze po dobu 7 dní. Rostliny byly poté přeneseny na mikroskopické

sklíčko, kde byly zakápnuty roztokem propidium jodidu, což je fluorescenční interkalační činidlo používané k barvení nukleových kyselin, vizualizaci jádra, nebo k hodnocení životaschopnosti buněk, jelikož je toto barvivo membránově nepropustné. Následně byly rostliny s roztokem propidium jodidu přikryty krycím sklem a byly pozorovány pomocí DSD2 mikroskopu se spinning diskem. U každé linie bylo pořízeno 30 snímků kořenové špičky, kdy se hodnotilo množství mrtvých buněk v každém kořenu a opět se porovnávaly výsledky dvojitéch mutantů s mutanty jednoduchými a kontrolou. Poté byly kořeny rostlin jednotlivých linií snímány pomocí konfokálního mikroskopu, díky čemuž jsme získali reprezentativní fotografie kořenových špiček.

4.4.8.3 Analýza replikační aktivity v kořenech měřením diferenciální zóny

Semena dvojitéch mutantů, jednoduchých mutantů a kontroly byla vysterilizována metodou kontrolovaného výsevu a následně vyseta na $\frac{1}{2}$ MS s 0,8% agarem a umístěna do fytotronové komory, kde byly kultivovány ve vertikální poloze po dobu 7 dní. Rostliny byly poté přeneseny na mikroskopické sklíčko, kde byly zakápnuty roztokem propidium jodidu a byly snímány na konfokálním mikroskopu. Následně se měřila délka diferenciální zóny jednotlivých kořenů a analyzovala se případná deformace buněk v této oblasti.

4.4.8.4 Efekt mutace na somatický vývoj rostlin

Semena dvojitéch mutantů, jednoduchých mutantů a kontroly byla vysterilizována metodou kontrolovaného výsevu a následně vyseta na $\frac{1}{2}$ MS s 0,6% agarem. Dvoutýdenní rostliny byly nejprve přesazeny do hlíny a byly umístěny do fytotronové komory. Následně byly čtyřtýdenní, pětítýdenní a šestitýdenní rostliny foceny rostlina po rostlině, díky čemuž byl somatický vývoj rostlin dvojitéch mutantů porovnáván s mutanty jednoduchými a s negativní kontrolou.

4.4.8.5 Senzitivita k různým genotoxickým látkám

Semena dvojitého mutantu (*rtell-1 smc6b-1*), jednoduchých mutantů (*rtell-1* a *smc6b-1*) a kontroly (Col-0) byla vysterilizována metodou pro kontrolovaný výsev a následně byla vyseta na růstové médium s 0,6% agarem. Po sedmi dnech byly rostliny jednotlivých linií přeneseny do tekutého $\frac{1}{2}$ MS média, každá do samostatné šestijamkové destičky, vždy deset rostlin do jedné jamky, kdy každá jamka obsahovala 4 ml růstového média. Rostliny byly přes noc ponechány bez přídavku chemikálií pro lepší adaptaci na tekuté médium a následujícího dne byl přidán vždy 1 ml média s chemikálií s výslednou koncentrací spočítanou na celkový objem 5 ml. Senzitivita rostlin byla testována k šesti chemikáliím: zebularinu, bleomycinu, mitomycinu C, camptothecinu a ICRF. Na miskách byly vždy dvě negativní kontroly a ve zbylých čtyřech jamkách byl vytvořen koncentrační gradient, viz Obrázek 4. Jednotlivé koncentrace genotoxických chemikálií jsou uvedeny v Tabulce 9.

NG1	1	2
3	4	NG2

Obrázek 4: Schéma rozvržení v šestijamkové destičce. NG1 = negativní kontrola 1, NG2 = negativní kontrola 2, 1 = nejvyšší koncentrace chemikálie, 2 = druhá nejvyšší koncentrace chemikálie, 3 = třetí nejvyšší koncentrace chemikálie, 4 = nejnižší koncentrace chemikálie.

Rostliny byly takto kultivovány po dobu 13 dnů, posléze byla zvážena jejich celková hmotnost. Z těchto dat byla vytvořena statistická analýza. Testování bylo provedeno ve dvou časově od sebe oddělených biologických replikátech.

Tabulka 9: Přehled koncentrací použitých pro jednotlivé genotoxické chemikálie.

Chemikálie	Koncentrace			
	1	2	3	4
zebularin	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
bleomycin	50 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	25 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	10 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	5 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$
MMC	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
CPT	20 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	10 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	5 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	2,5 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$
ICRF	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

5 VÝSLEDKY

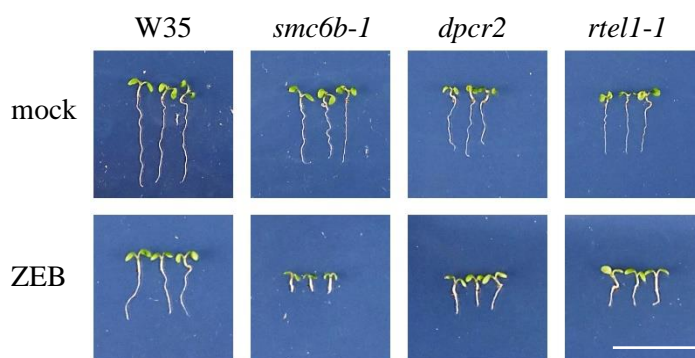
5.1 Kandidátní linie *dpcr2*

5.1.1 Selektce homozygotních mutantů

Homozygotní mutanti byly vyselektováni pomocí PCR genotypování. DNA vyizolovaná z jednotlivých rostlin byla amplifikována primery specifickými pro gen a inzert, viz Tabulka 6, a následně elektroforeticky rozdělena na gelu. Po vizualizaci elektroforetogramu byli vybráni jedinci obsahující pouze produkty odpovídající inzertu.

5.1.2 Validace kandidátních genů

Pro validaci *zes3-13* kandidátního genu byla vyseta semena homozygotních mutantů T-DNA linie na ½ MS médium s 0,6% agarem (mock), a také na ½ MS médium s 0,6% agarem a s přidavkem 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ zebularinu (ZEB). Rostliny byly hodnoceny na základě délky kořene v porovnání s kontrolními rostlinami. Rostlinná linie W35, která je vůči zebularinu rezistentní, sloužila jako negativní kontrola a *smc6b-1* mutantní rostliny, jež jsou vysoce senzitivní, sloužily jako kontrola pozitivní. Opravdový kandidát musí na médiu se zebularinem vykazovat značné zkrácení kořene a omezení růstu oproti negativní kontrole, načež na médiu bez chemikálie se délkou kořene k negativní kontrole přibližuje. Tento projev kandidátních rostlin lze vidět na Obrázku 5. Rostliny T-DNA linie byly také srovnány s *dpcr2* kandidátem vybraným z EMS mutantních linií, na jehož základě byla objednána daná T-DNA linie. U těchto rostlin byla pozorována podobná délka kořene na ½ MS i na ½ MS se zebularinem. Jednotlivé fenotypy jsou uvedeny na Obrázku 5.

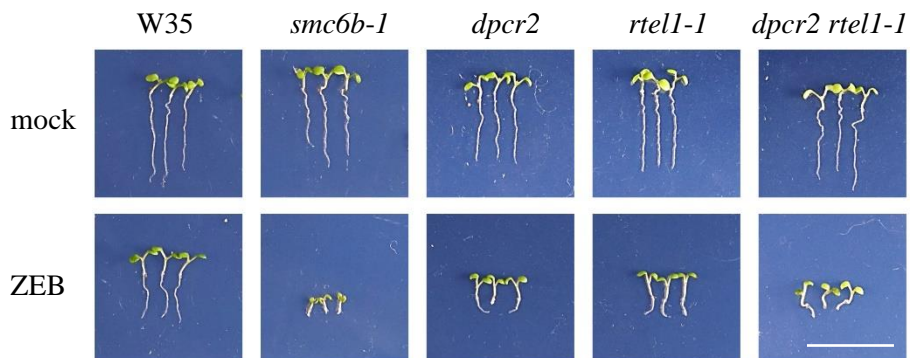


Obrázek 5: Analýza délky kořene jednotlivých rostlinných linií na ½ MS médiu (mock) a na ½ MS médiu se zebularinem (ZEB).

W35 negativní kontrola, *smc6b-1* pozitivní kontrola, *dpcr2* EMS linie určena k validaci, *rtell-1* T-DNA linie. Měřítka = 1 cm.

5.1.3 Komplementační křížení

Komplementačním křížením bylo analyzováno, zda kandidátní rostlina *dpcr2* nese mutaci ve stejném genu jako T-DNA linie *rtell-1*. Na Obrázku 6 je uveden výsledek komplementačního křížení včetně kontrol (W35 – negativní, *smc6b-1* – pozitivní, *dpcr2* kandidát, *rtell-1* T-DNA linie). U rostlin byla po křížení analyzována délka kořeně na ½ MS médiu s 0,6% agarem (mock) a na ½ MS médiu s 0,6% agarem a s 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ zebularinu (ZEB). Komplementačním křížením bylo prokázáno, že mutace leží v tomtéž genu, jelikož po křížení byla vyprodukována generace se 100 % senzitivních rostlin na zebularin. Pokud by mutace byla v jiném genu, pak by vzniklá populace byla k zebularinu rezistentní.

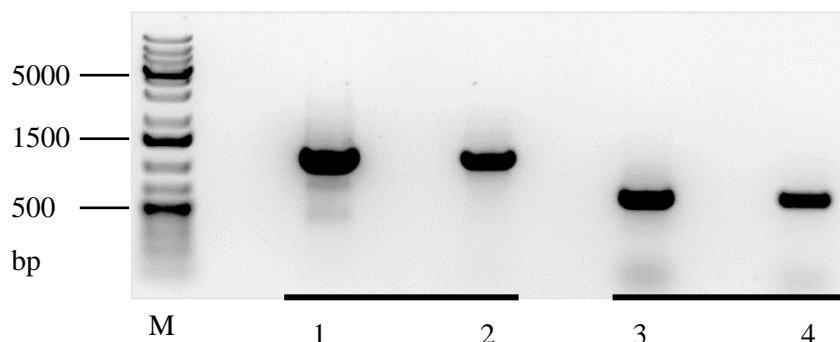


Obrázek 6: Komplementační křížení kandidátní rostliny *dpcr2* na ½ MS médiu (mock) a na ½ MS médiu se zebularinem (ZEB).

W35 negativní kontrola, *smc6b-1* pozitivní kontrola, *dpcr2* EMS linie určena k validaci, *rtell-1* T-DNA linie a *dpcr2 rtell-1* dvojitý mutant vzniklý křížením. Měřítko = 1 cm.

5.1.4 Ověření mutace Sangerovým sekvenováním

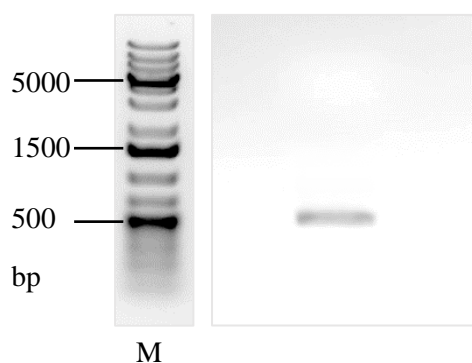
Pro ověření pozice mutace Sangerovým sekvenováním byla z *dpcr2* kandidátních rostlin nejprve izolována DNA, která byla následně amplifikována pomocí specifických primerů pro *RTEL1* gen a následně byla elektroforeticky separována. Produkty příslušné velikosti byly vyřezány z gelu, purifikovány a odeslány na sekvenování společně s negativní kontrolou W35.



Obrázek 7: *RTEL1* genové produkty *dpcr2* kandidátní linie a negativní kontroly W35 s očekávanou velikostí produktů 1222 bp a 685 bp. Sekvence viz Obrázek 9 a 10.

Jamka 1 a 3 = W35, jamky 2 a 4 = *dpcr2*. M = marker molekulové hmotnosti, 1kb DNA ladder Plus. Použité primery podrobněji v Tabulce 6.

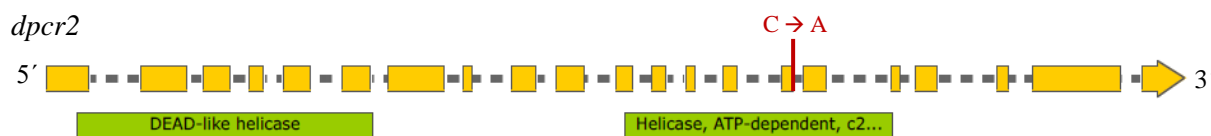
Po ověření mutace v genomové sekvenci bylo nezbytné potvrdit efekt mutace na úrovni transkriptu. Byla vyizolována RNA, z níž byla nasynthetizována cDNA, která byla taktéž amplifikována, elektroforeticky separována, vyříznuta z gelu, purifikována a odeslána na sekvenování firmou SEQme. Očekávaná délka produktu byla 566 bp, kdy byl získán produkt kratší.



Obrázek 8: Elektroforetická separace cDNA *dpcr2* kandidátní linie s očekávanou velikostí produktu 566 bp. Sekvence viz Obrázek 11.

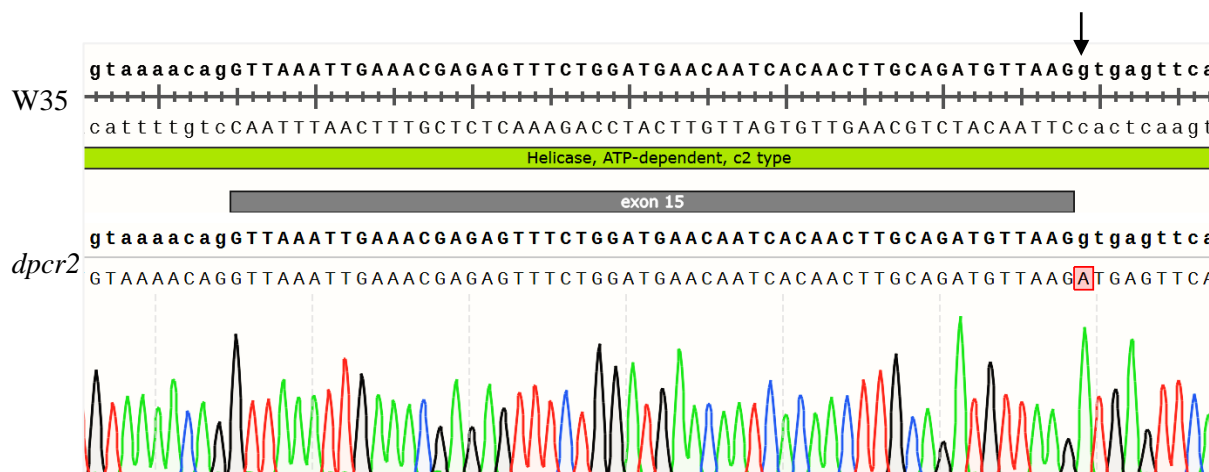
M = marker molekulové hmotnosti, 1kb DNA ladder Plus. Použité primery podrobněji v Tabulce 6.

Porovnáním sekvencí příslušného lokusu *dpcr2* kandidáta a kontroly W35, bylo následně zjištěno, že u mutantní linie došlo k záměně cytosinu za adenin v části genu odpovídající ATP-dependentní doméně, což je zobrazeno na mapě *RTEL1* genu, viz Obrázek 9.

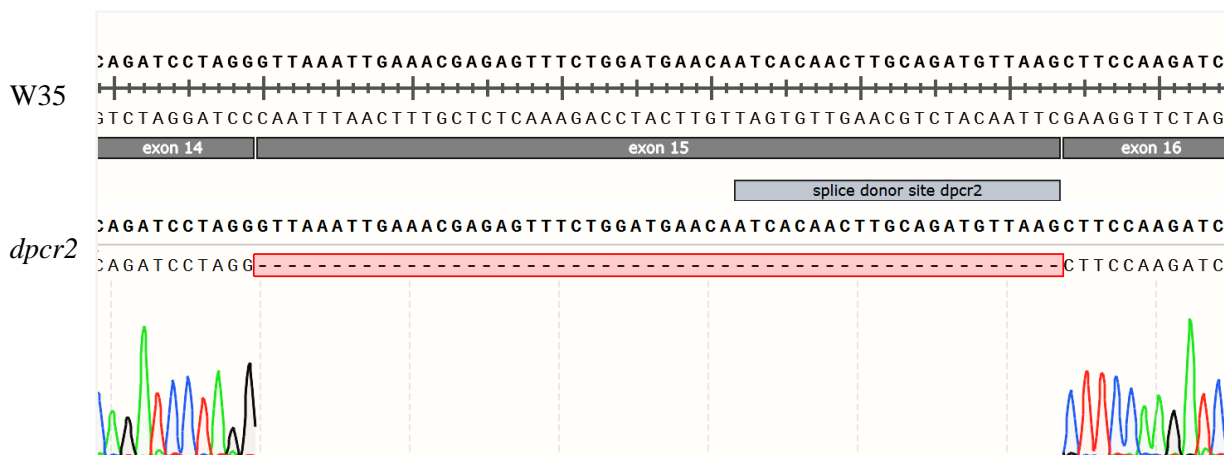


Obrázek 9: Schématické znázornění genu *RTEL1* u *Arabidopsis thaliana*.

Černá čára = introny, žluté boxy = exony, zelené zvýraznění = domény (DEAD-like helikázová doména a ATP-dependentní helikázová doména). Mutace *dpcr2* způsobuje záměnu C za A v oblasti intronu před exonem 15, *rtell-1* je T-DNA inserce přerušující gen v exonu 6 v DEAD-like helikázové doméně.



Obrázek 10: Srovnání sekvencí genomové DNA W35 kontrolní linie s *dpcr2* kandidátní liníí, ve které došlo ke záměně cytosinu za adenin v ATP-dependentní helikázové doméně.

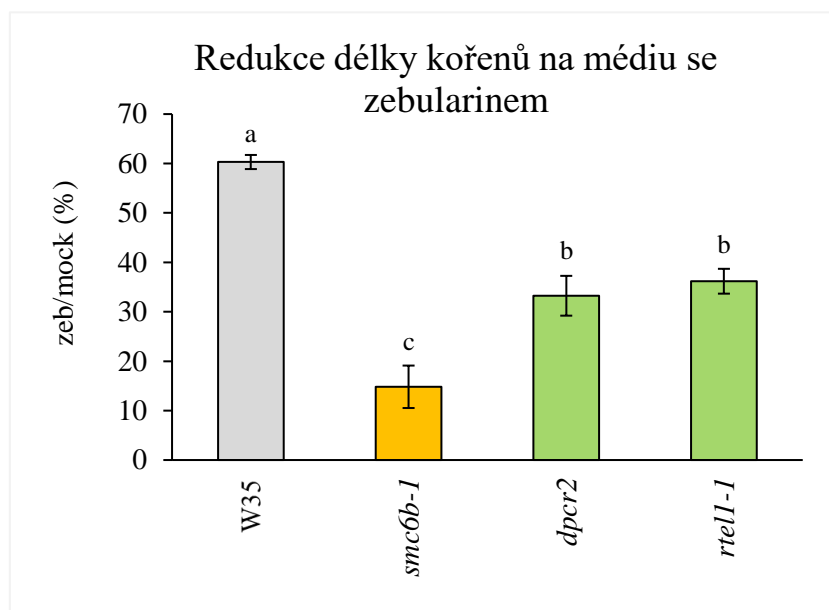


Obrázek 11: Srovnání cDNA sekvencí W35 kontrolní linie a *dpcr2* kandidátní linie, u které došlo k vystřížení exonu 15 (jedná se o tzv. splice donor site variantu).

Srovnáním sekvencí cDNA na Obrázku 11, lze vidět, že záměna cytosinu za adenin způsobuje vystřížení celého exonu 15. Na 3' konci tohoto exonu se nachází splice donor site místo, jež ovlivňuje sestřih mRNA vlákna. Díky jednonukleotidové záměně v sekvenci intronu za 3' koncem exonu 15 dochází ke změně sestřihu mRNA vlákna. Vystřížení exonu způsobuje pravděpodobně nefunkčnost celého proteinu, jelikož postihuje právě ATP-dependentní helikázovou doménu.

5.1.5 Citlivost identifikovaných kandidátů k zebularinu

Analýza fenotypu byla provedena pomocí měření délky kořenů kandidátní linie *dpcr2* ve srovnání s T-DNA linií *rtell-1* a kontrolními liniemi. Rostliny byly vysazeny na ½ MS médium s 0,6% agarem bez přídavku chemikálií a na ½ MS médium s 0,6% agarem s přídavkem 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ zebularinu. Byla měřena délka kořenů sedmidenních rostlin, a to ve třech samostatných biologických replikátech. Z hodnot naměřených délek kořenů byla následně vyhodnocena statistická analýza v programu ANOVA a byla provedena také srovnávací analýza Tukey testem, který umožňuje nezávisle srovnat průměry různých vzorků v rámci jednoho experimentu a vyhodnocuje tak stejné a odlišné skupiny. Statistickou analýzou byly rostlinné linie rozřazeny podle citlivosti k zebularinu do tří skupin. Skupinu A tvoří W35 rostlinná linie, jež je rezistentní k zebularinu, skupinu B tvoří linie *dpcr2* a *rtell-1* vykazující velmi podobnou senzitivitu k zebularinu a skupina C zahrnuje vysoce senzitivní rostlinnou linii *smc6b-1* sloužící jako pozitivní kontrola.



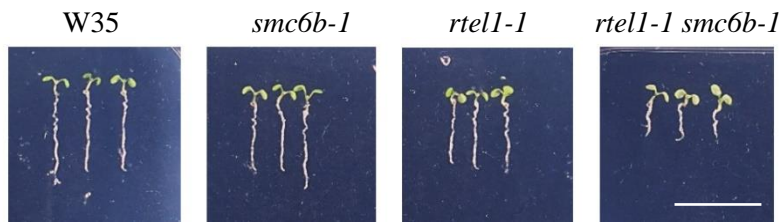
Graf 1: Analýza fenotypu *rtell-1* a *dpcr2* linie ve srovnání s negativní kontrolou W35 a pozitivní kontrolou *smc6b-1*.

Genotypy označené stejným písmenem nejsou signifikantně odlišné (jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA doplněna mnohonasobným porovnáním Tukey-HSD). $P < 0,05$. $n > 20$. Směrodatné odchylky označují průměr ze tří biologických replikátů.

5.2 Analýza fenotypu dvojitéch mutantů

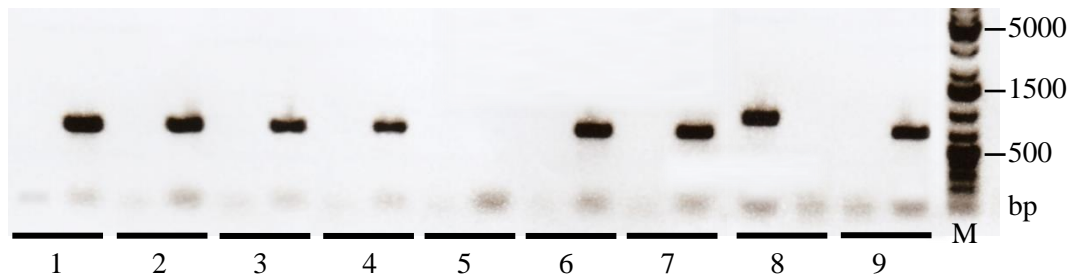
5.2.1 Selektce dvojitéch homozygotních mutantů

Dvojitě homozygotní mutanti byly vyselektováni pomocí amplifikace vyizolované DNA z jednotlivých rostlin a následnému elektroforetickému rozdělení na gelu. Rozlišení genového produktu a inzertu bylo docíleno pomocí specifických primerů navržených na T-DNA linii (viz Tabulka 6). Pomocí genotypování dvou alelových sekvencí odpovídajících genu a inzertu, byly vyselektováni dvojití mutanti *rtell-1 smc6b-1*, *rtell-1 nse4a-2* a *rtell-1 hpy2-2*.



Obrázek 12: Analýza délky kořene *rtell-1 smc6b-1* mutantní linie na ½ MS médiu (mock).

W35 negativní kontrola, *smc6b-1* a *rtell-1* jednoduché mutantní linie, *rtell-1 smc6b-1* linie dvojitých mutantů. Měřítka = 1 cm.

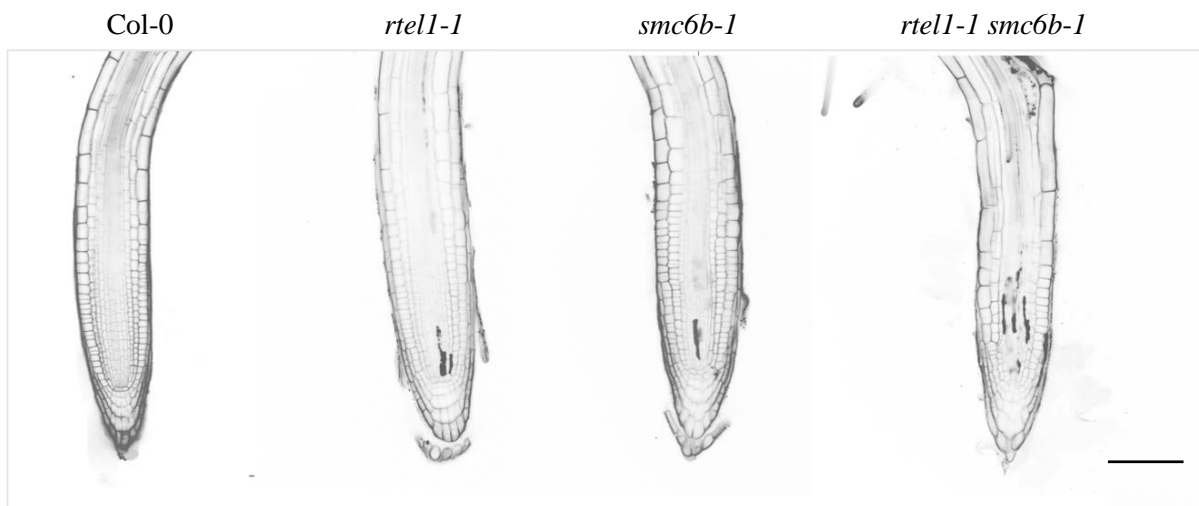


Obrázek 13: PCR genotypování *rtell-1 smc6b-1* dvojitého mutantu na přítomnost inzertní alely *smc6b-1*.

Jamky 1 – 7 = vzorky. Jamky 8 = Col-0 negativní kontrola. Jamky 9 = *smc6b-1* pozitivní kontrola. První jamka: amplifikace původního genu. Druhá jamka: amplifikace inzertní alely *smc6b-1*. M = marker molekulové hmotnosti, 1kb DNA ladder Plus. Primery podrobněji v Tabulce 6.

5.2.2 Analýza buněčné smrti u *rtell-1 smc6b-1* linie

Analýza buněčné smrti byla založena na pozorování počtu odumřelých buněk v kořenovém meristému. Kořeny sedmidenních rostlin byly barveny propidium jodidem a pozorovány DSD2 mikroskopem se spinning diskem. Hodnoceny byly čtyři linie: Col-0, jako negativní kontrola, linie jednoduchých mutantů *rtell-1* a *smc6b-1* a dvojití mutanti *rtell-1 smc6b-1*. Celkem bylo hodnoceno 30 rostlin od každé linie a následně byly vytvořeny reprezentativní fotografie jednotlivých linií na konfokálním mikroskopu, viz Obrázek 14.



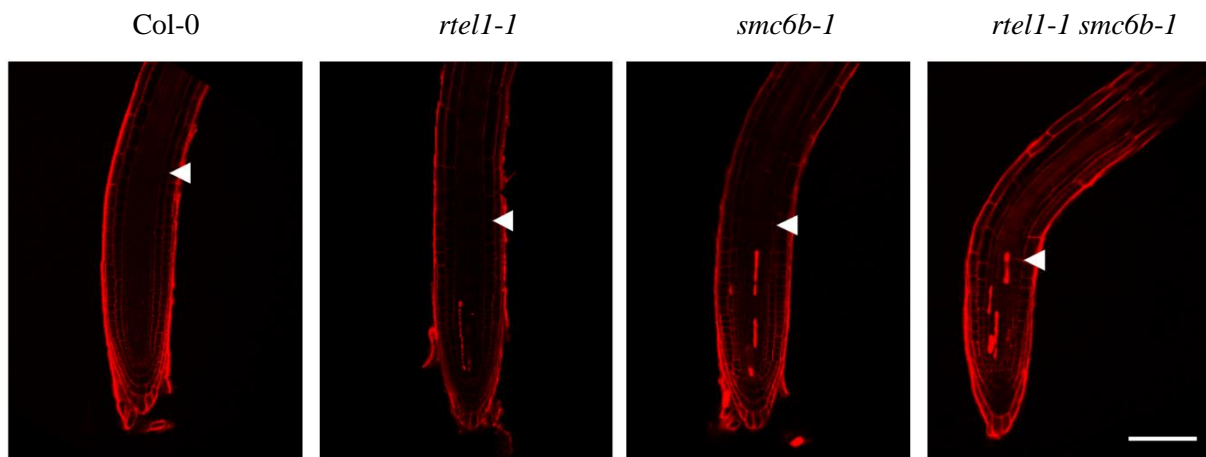
Obrázek 14: Analýza buněčné smrti v kořenovém meristému jednotlivých linií.

Col-0 (negativní kontrola), *rtell-1* a *smc6b-1* (kontrolní linie jednoduchých mutantů) a *rtell-1 smc6b-1* (dvojitý mutant). Kořeny byly barveny vitální barvou propidium jodidem. Tmavá místa v kořeni značí mrtvé buňky. Měřítko = 100 μ m.

Analýzou buněčné smrti bylo zjištěno, že u negativní kontroly Col-0 k odumírání buněk v kořenovém meristému nedochází a architektura kořene je neporušená, u *rtell-1* a *smc6b-1* jednoduchých mutantů dochází k odumírání jedné až dvou buněk s mírnými změnami v kořenové architektuře. U dvojitých mutantů dochází k odumírání většího počtu buněk v kořenovém meristému, dochází ke značnému narušení kořenové architektury, viditelnému zkrácení diferenciální zóny kořene a jeho celkovému zkrácení. U dvojitých mutantů lze také vidět posun zóny kořenového vlášení blíže ke kořenové špičce.

5.2.3 Měření diferenciální zóny u dvojitých mutantů *rtell-1 smc6b-1*

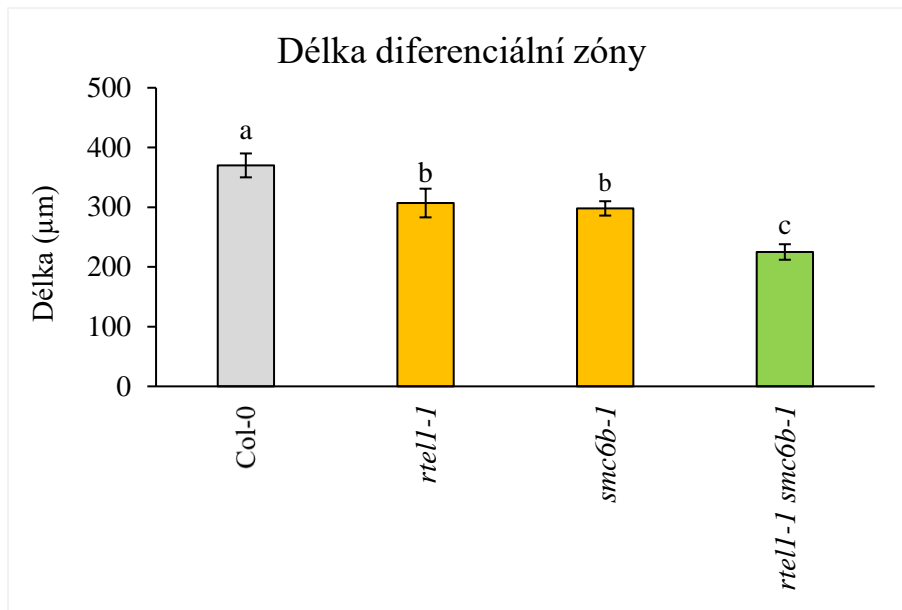
Měření diferenciální zóny bylo provedeno na sedmidenních rostlinách za použití propidium jodidového barvení. Na DSD2 mikroskopu byly pozorovány kořeny rostlin s následným pořízením snímku každého kořene. Poté byly změřeny délky diferenciální zóny jednotlivých rostlinných linií: Col-0 negativní kontroly, jednoduchých mutantů *rtell-1* a *smc6b-1* a dvojitých mutantů *rtell-1 smc6b-1*. Reprezentativní fotografie jsou uvedeny na Obrázku 15. Naměřené hodnoty byly zpracovány statistickou analýzou v programu ANOVA (jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA doplněna mnohonásobným porovnáním Tukey-HSD) a byl z nich vytvořen Graf 2.



Obrázek 15: Analýza délky diferenciální zóny jednotlivých rostlinných linií.

Col-0 (negativní kontrola), *rtell-1* a *smc6b-1* (kontrolní linie jednoduchých mutantů) a *rtell-1 smc6b-1* (dvojitý mutant). Kořeny byly barveny propidium jodidem, foceny na konfokálním mikroskopu a délka meristematické zóny byla měřena v programu ImageJ. Bílá šipka označuje místo přechodu mezi meristematickou a diferenciální zónou kořene. Měřítko = 100 μm .

Na Obrázku 15 je označen konec diferenciální zóny u kořene každé linie. U jednoduchých mutantů lze vidět mírné zkrácení diferenciální zóny oproti kontrolní rostlině Col-0. U dvojitého mutantu *rtell-1 smc6b-1* lze pak vidět zkrácení této zóny oproti kontrolní rostlině výrazněji. Lépe je zkrácení diferenciální zóny znázorněno v Grafu 2. Z naměřených hodnot byla vyhodnocena statistická analýza programem ANOVA (jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA doplněna mnohonásobným porovnáním Tukey-HSD), díky kterým byly rostlinné linie rozděleny do tří skupin. Skupina A zahrnuje Col-0 negativní kontrolu, skupina B zahrnuje *rtell-1* a *smc6b-1* mutantní linie a skupinu C tvoří dvojitý mutant *rtell-1 smc6b-1*. Z těchto dat vyplývá, že u dvojitého mutantu došlo ke zkrácení diferenciální zóny o více než 100 μm oproti Col-0 rostlinné linii a o více než 50 μm oproti jednoduchým mutantním liniím.



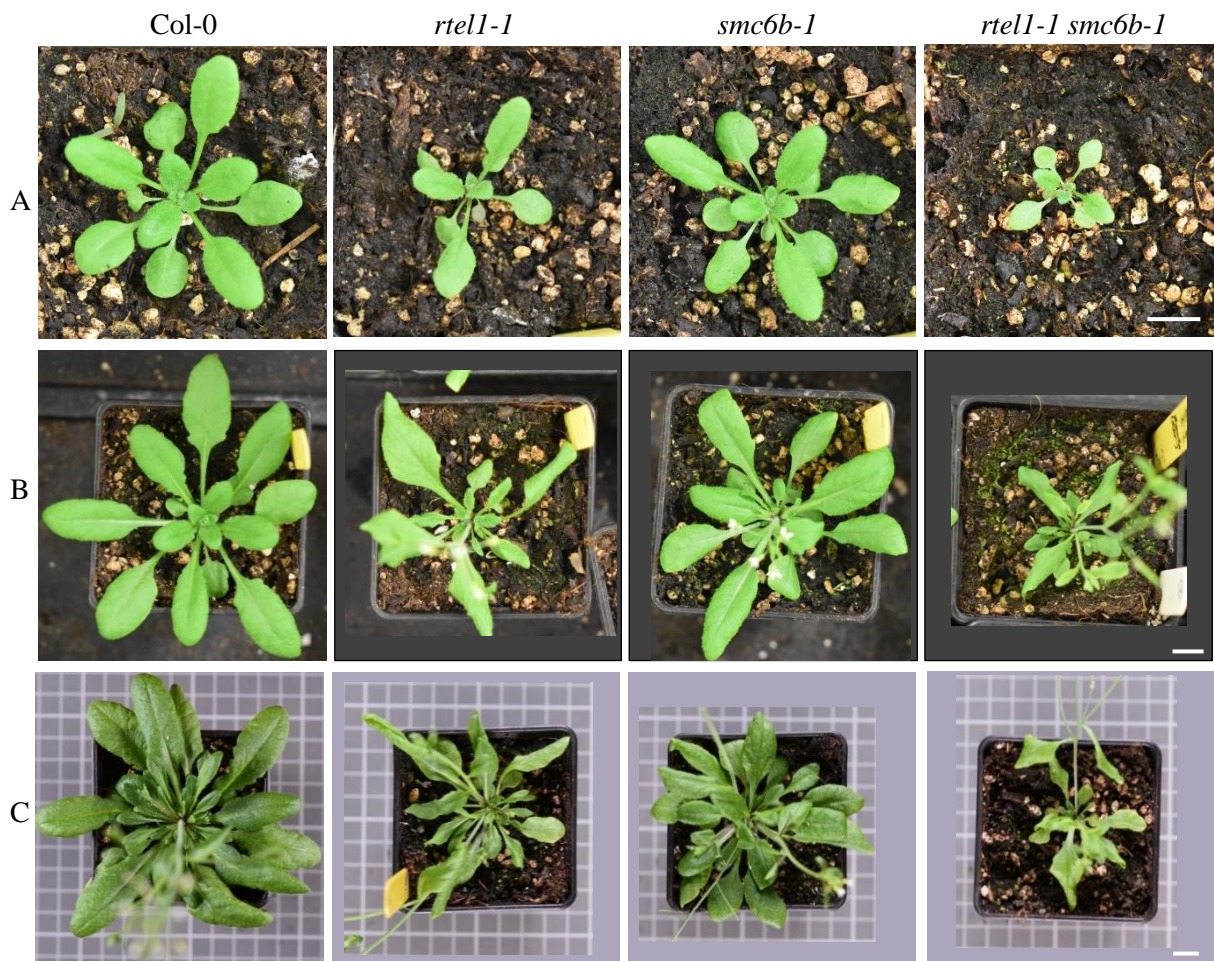
Graf 2: Analýza délky diferenciální zóny u jednotlivých rostlinných linií.

Col-0 (negativní kontrola), *rtell-1* a *smc6b-1* (kontrolní linie jednoduchých mutantů) a *rtell-1 smc6b-1* (dvojitý mutant). Genotypy označené stejným písmenem nejsou signifikantně odlišné (jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA doplněna mnohonásobným porovnáním Tukey-HSD). $P < 0,05$. $n > 20$. Směrodatné odchylky označují průměr z jednoho biologického replikátu.

5.2.4 Efekt mutace na somatický vývoj rostlin

5.2.4.1 Dvojití mutanti *rtell-1 smc6b-1*

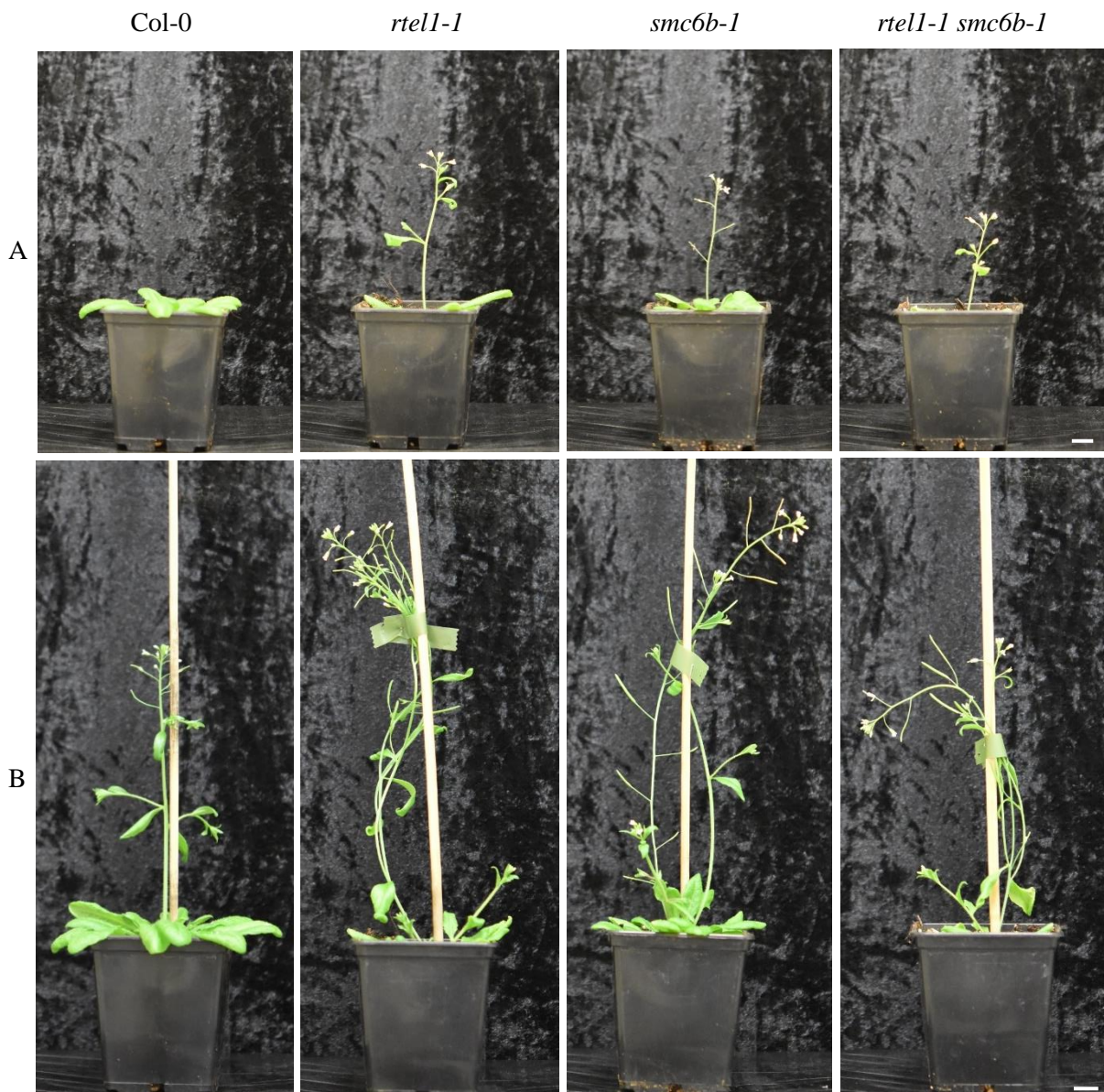
Semena jednotlivých rostlinných linií byla vysazena na ½ MS médium a po sedmi dnech byly rostliny přeneseny z živného média do substrátu. Fenotyp rostlin byl analyzován u čtyřtýdenních, pětítýdenních a šestitýdenních rostlin.



Obrázek 16: Analýza efektu mutace na somatický vývoj dvojitého mutantu *rtell-1 smc6b-1* v porovnání s jednotlivými rostlinnými liniemi.

Col-0 negativní kontrola, *rtell-1* a *smc6b-1* kontrolní linie jednoduchých mutantů, *rtell-1 smc6b-1* dvojitý mutant. A = čtyřtýdenní rostliny, B = pětítýdenní rostliny, C = šestitýdenní rostliny. Měřítko = 1 cm.

Na Obrázku 16 v řádku A jsou zobrazeny čtyřtýdenní juvenilní rostliny, u nichž lze vidět zmenšení rostliny jednoduchého mutantu *rtell-1* oproti kontrolní rostlině, a také výrazné zmenšení dvojitého mutantu *rtell-1 smc6b-1*, jak oproti Col-0 negativní kontrole, tak i oproti jednoduchým mutantům. Řádek B zahrnuje pětítýdenní rostliny, kdy je rostlina jednoduchého mutantu *rtell-1* menší oproti negativní kontrole, a navíc má deformované podlouhlé listy. Rostlina *rtell-1 smc6b-1* dvojitého mutantu je výrazně menší oproti ostatním rostlinným liniím a má také výrazně deformované podlouhlé listy. U všech mutantních linií lze pozorovat již vytvořený stonk a květ oproti negativní kontrole. Řádek C zobrazuje šestitýdenní rostliny, u nichž jsou rozdíly nejlépe viditelné. U rostliny *rtell-1* mutantu lze opět sledovat menší velikost jak oproti Col-0, tak i oproti *smc6b-1* linii. Dále lze u jednoduchého mutantu pozorovat deformaci listů. Dvojitý mutant *rtell-1 smc6b-1* je opět výrazně menší oproti ostatním rostlinným liniím s výrazně deformovanými zúženými listy.



Obrázek 17: Analýza efektu mutace na somatický vývoj dvojitého mutantu *rtell-1 smc6b-1* v porovnání s jednotlivými rostlinnými liniemi v horizontální poloze.

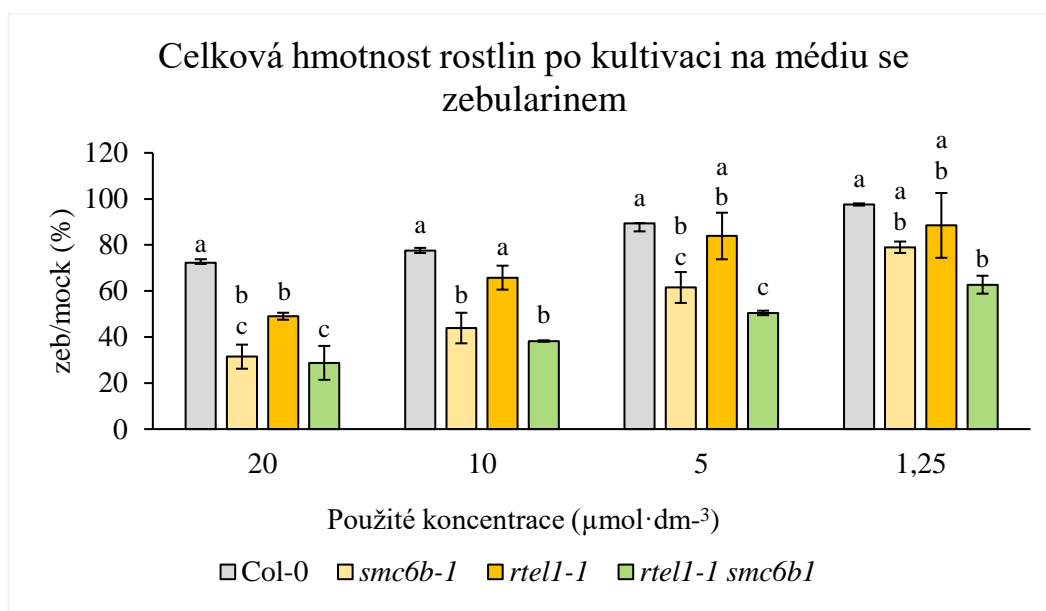
Col-0 negativní kontrola, *rtell-1* a *smc6b-1* kontrolní linie jednoduchých mutantů, *rtell-1 smc6b-1* dvojitý mutant. A = pětítýdenní rostliny, B = šestítýdenní rostliny. Měřítka = 1 cm.

Obrázek 17 zobrazuje pětítýdenní a šestítýdenní rostliny jednotlivých rostlinných linií v horizontální poloze, kdy v řádku A lze vidět, že všechny mutantní linie oproti Col-0 negativní kontrole vytvořily již stonku a květ. I zde lze sledovat výrazně menší velikost *rtell-1 smc6b-1* dvojitého mutantu ve srovnání s ostatními rostlinami. Řádek B zahrnuje šestítýdenní rostliny. U Col-0 negativní kontroly došlo také ke tvorbě stonku a květu, avšak své maximální velikosti ještě nedosáhla. Mutantní rostliny své maximální velikosti již dosáhly díky čemuž lze vidět, že dvojitý mutant *rtell-1 smc6b-1* má výrazně kratší stonku oproti jednoduchým mutantům. Zároveň i zde lze vidět jeho menší velikost oproti ostatním rostlinným liniím. Celkově lze pak vyhodnotit, že *rtell-1 smc6b-1* dvojitý mutant má výrazně zhoršený somatický vývoj oproti kontrolním rostlinám, a to zejména kvůli nápadnému zmenšení celé rostliny,

a také kvůli silné deformaci listů. Z těchto dat lze usuzovat, že se faktory RTEL1 a SMC6B uplatňují při somatickém vývoji rostlin v různých drahách.

5.2.5 Analýza senzitivity ke genotoxickým látkám u dvojitých mutantů *rtell-1 smc6b-1*

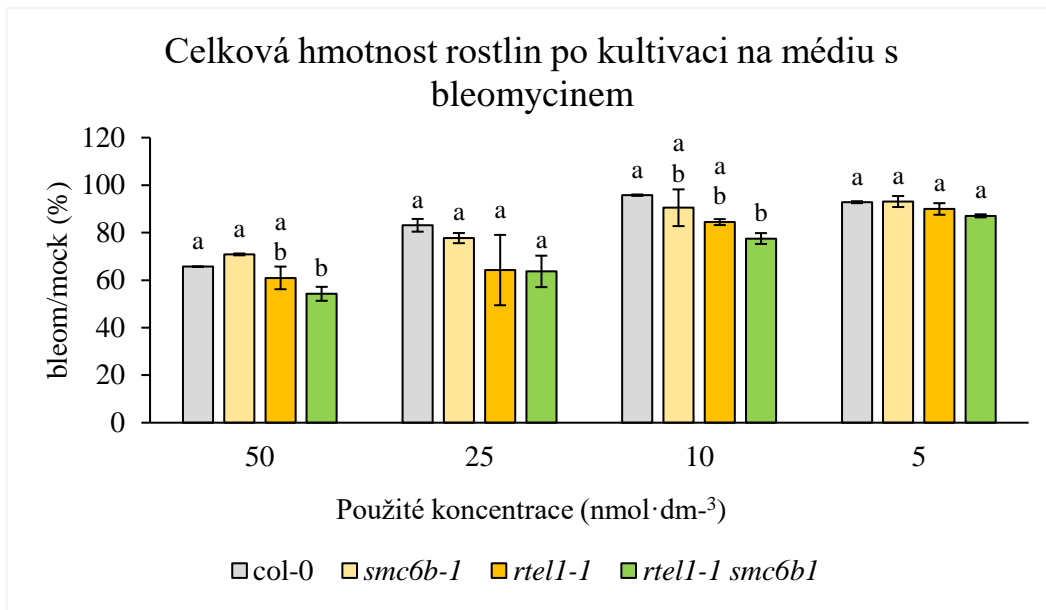
Senzitivita ke genotoxickým látkám byla analyzována u dvojitých mutantů *rtell-1 smc6b-1* ve dvou samostatných biologických replikátech, třetí replikát nebyl z časových důvodů zrealizován. Testovány byly tyto rostlinné linie: Col-0 linie jako negativní kontrola, *rtell-1* a *smc6b-1* jednoduché mutantní linie a *rtell-1 smc6b-1* dvojitá mutantní linie. Senzitivita rostlin byla testována k pěti genotoxickým činidlům, a to zebularinu, bleomycinu, mitomycinu C, camptothecinu a ICRF, vždy ve čtyřech různých koncentracích. Použití různých koncentrací mělo zajistit pozorování různé škály působení genotoxických látek, díky čemuž bylo možno odhalit i drobné změny. Následně byl analyzován úbytek hmotnosti na médiu s chemikálií v porovnání s médiem bez chemikálie.



Graf 3: Analýza senzitivity dvojitého mutantu *rtell-1 smc6b-1* k zebularinu.

Col-0 negativní kontrola, *rtell-1* a *smc6b-1* kontrolní linie jednoduchých mutantů a *rtell-1 smc6b-1* dvojitý mutant. Genotypy označené stejným písmenem nejsou signifikantně odlišné (jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA doplněna mnohonásobným porovnáním Tukey-HSD). $P < 0,05$. $n > 20$. Směrodatné odchylky označují průměr ze dvou biologických replikátů.

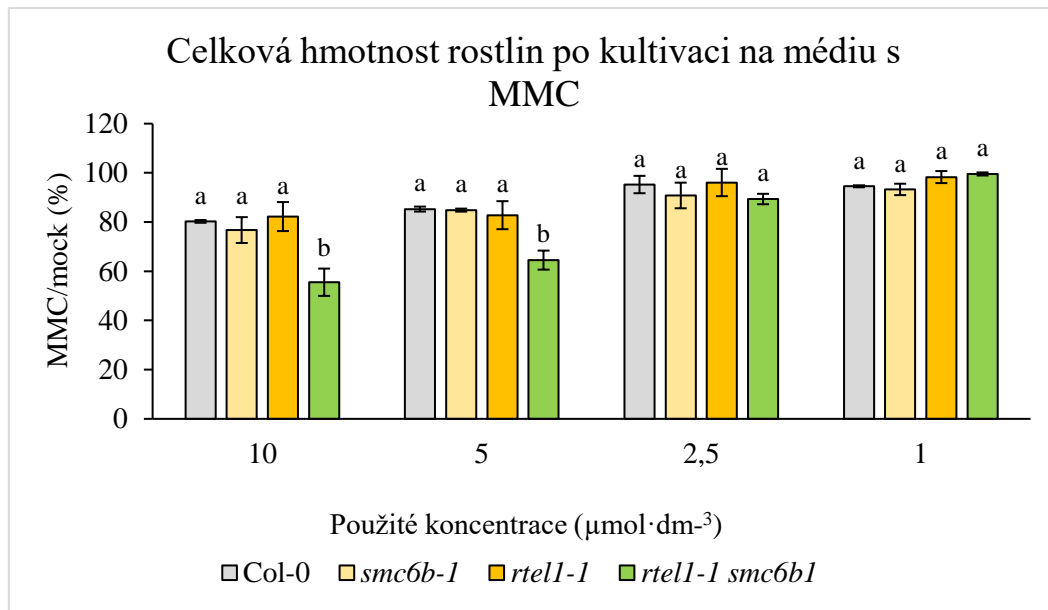
Rostlinné linie byly po kultivaci na médiu se zebularinem hodnoceny statistickou analýzou rozptylu ANOVA doplněnou o mnohonásobné porovnání Tukey-HSD. K zebularinu vykazuje nejvyšší citlivost dvojitá mutantní linie *rtell-1 smc6b-1* společně s linií jednoduchých mutantů *smc6b-1*, která je však k zebularinu extrémně citlivá. Nemožnost rozlišení senzitivity těchto dvou rostlinných linií je způsobeno buď participací těchto faktorů ve stejné dráze, nebo nedostatečným opakováním analýzy.



Graf 4: Analýza senzitivity dvojitého mutantu *rtell-1 smc6b-1* k bleomycinu.

Col-0 negativní kontrola, *rtell-1* a *smc6b-1* kontrolní linie jednoduchých mutantů a *rtell-1 smc6b-1* dvojitý mutant. Genotypy označené stejným písmenem nejsou signifikantně odlišné (jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA doplněna mnohonásobným porovnáním Tukey-HSD). $P < 0,05$. $n > 20$. Směrodatné odchylky označují průměr ze dvou biologických replikátů.

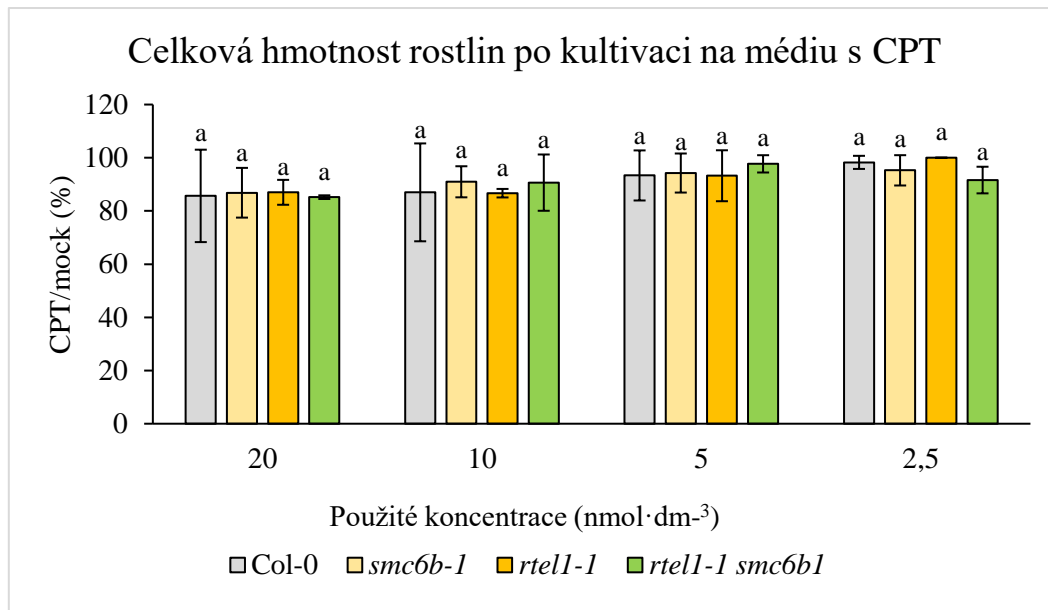
Rostlinné linie byly po kultivaci na médiu s bleomycinem hodnoceny statistickou analýzou rozptylu ANOVA doplněnou o mnohonásobné porovnání Tukey-HSD. U třech vyšších koncentrací vykazuje k bleomycinu nejvyšší citlivost *rtell-1 smc6b-1* dvojitá mutantní linie společně s linií jednoduchých mutantů *rtell-1*. Nemožnost rozlišení senzitivity těchto dvou rostlinných linií je způsobeno buď participací těchto faktorů ve stejné dráze, nebo nedostatečným opakováním analýzy.



Graf 5: Analýza senzitivity dvojitého mutantu *rtell-1 smc6b-1* k MMC.

Col-0 negativní kontrola, *rtell-1* a *smc6b-1* kontrolní linie jednoduchých mutantů a *rtell-1 smc6b-1* dvojitý mutant. Genotypy označené stejným písmenem nejsou signifikantně odlišné (jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA doplněna mnohonásobným porovnáním Tukey-HSD). $P < 0,05$. $n > 20$. Směrodatné odchylky označují průměr ze dvou biologických replikátů.

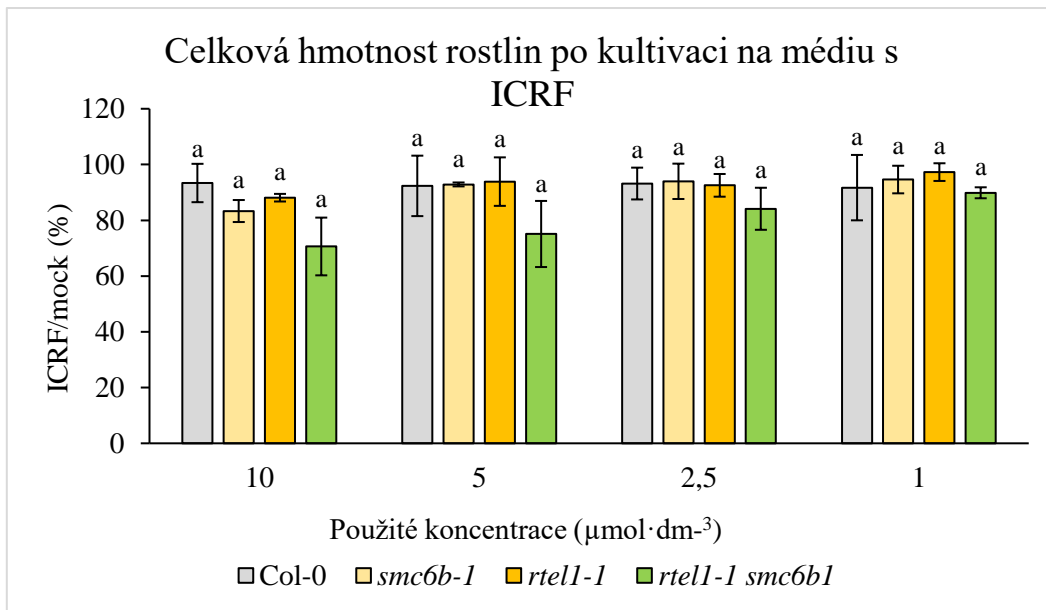
Rostlinné linie byly po kultivaci na médiu s MMC čínidlem rozděleny statistickou analýzou rozptylu ANOVA doplněnou o mnohonásobné porovnání Tukey-HSD do skupin dle své senzitivity (úbytku celkové hmotnosti rostlin). Senzitivitu rostlin lze pozorovat pouze při použití vyšších koncentrací 10 a 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MMC v médiu. V obou případech použitých koncentrací tvoří skupinu A rostlinné linie negativní kontroly Col-0 a obě linie jednoduchých mutantů *rtell-1* a *smc6b-1*. Skupinu B poté tvoří samostatně linie dvojitých mutantů *rtell-1 smc6b-1*, která vykazuje na toto čínidlo výraznou senzitivitu v porovnání s ostatními liniemi. Při použití obou vyšších koncentrací čínidla došlo u dvojitých mutantů k úbytku hmotnosti o více než 20 % ve srovnání s negativní kontrolou.



Graf 6: Analýza senzitivity dvojitého mutantu *rtell-1 smc6b-1* k CPT.

Col-0 negativní kontrola, *rtell-1* a *smc6b-1* kontrolní linie jednoduchých mutantů a *rtell-1 smc6b-1* dvojitý mutant. Genotypy označené stejným písmenem nejsou významně odlišné (jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA doplněna mnohonásobným porovnáním Tukey-HSD). $P < 0,05$. $n > 20$. Směrodatné odchylky označují průměr ze dvou biologických replikátů.

Rostlinné linie byly po kultivaci na médiu s CPT hodnoceny statistickou analýzou rozptylu ANOVA doplněnou o mnohonásobné porovnání Tukey-HSD. Byla hodnocena senzitivita rostlin pomocí úbytku jejich celkové hmotnosti. U této analýzy však nelze pozorovat žádné rozdíly mezi senzitivitami jednotlivých rostlinných linií.



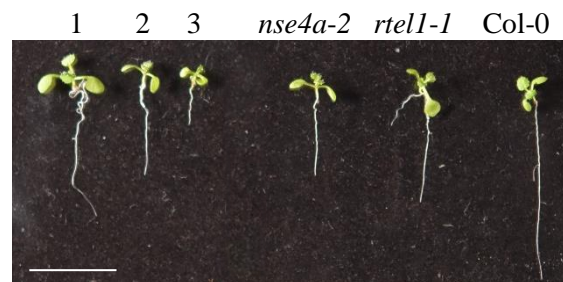
Graf 7: Analýza senzitivity dvojitého mutantu *rtell-1 smc6b-1* k ICRF.

Col-0 negativní kontrola, *rtell-1* a *smc6b-1* kontrolní linie jednoduchých mutantů a *rtell-1 smc6b-1* dvojitý mutant. Genotypy označené stejným písmenem nejsou signifikantně odlišné (jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA doplněna mnohonásobným porovnáním Tukey-HSD). $P < 0,05$. $n > 20$. Směrodatné odchylky označují průměr ze dvou biologických replikátů.

Rostlinné linie byly po kultivaci na médiu s ICRF hodnoceny statistickou analýzou rozptylu ANOVA doplněnou o mnohonásobné porovnání Tukey-HSD. Rostlinné linie byly u všech čtyř použitých koncentrací sloučeny pouze do jedné skupiny. Hodnoty úbytku hmotnosti jednotlivých rostlinných linií si byly tedy statisticky blízké. I přes tuto skutečnost lze však u nejvyšších dvou použitých koncentrací sledovat výraznější úbytek hmotnosti u *rtell-1 smc6b-1* linie dvojitých mutantů, u nichž došlo ke zmenšení hmotnosti o 23 % při použití koncentrace $10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a o 17 % při použití koncentrace $5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ oproti negativní kontrole Col-0.

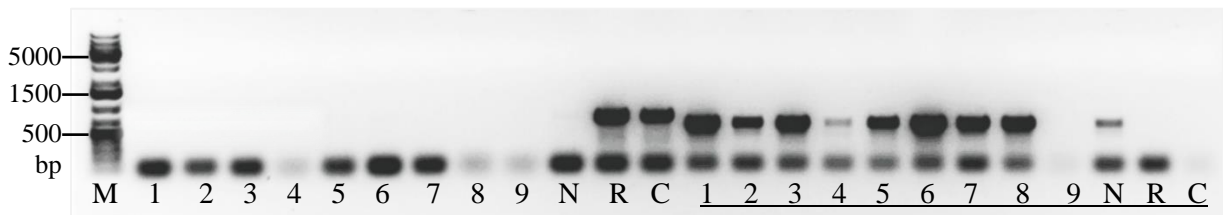
5.2.5.1 Dvojití mutanti *rtell-1 nse4a-2*

Pomocí PCR genotypování byly vyselektovány dvojití mutanti *rtell-1 nse4a-2*, avšak po jejich samosprášení nebyla vyprodukována homogenní populace homozygotních rostlin. Genotypování zřejmě nebylo provedeno úspěšně, a proto se v populaci nacházely i heterozygotní rostliny. Z tohoto důvodu bylo provedeno ještě jedno ověření, viz Obrázek 18, kdy byly tři čtrnáctidenní rostliny různých fenotypů genotypovány a bylo potvrzeno, že rostlina 3 odpovídá recesivnímu homozygotu. Následně byli další kandidáti vybíráni dle fenotypu. Celkem bylo vybráno osm kandidátních rostlin, u nichž se provedlo kontrolní genotypování, viz Obrázek 19. To potvrdilo, že daný fenotyp odpovídal recesivním homozygotům.



Obrázek 18: Různé fenotypy *rtell-1 nse4a-2* dvojitých mutantů.

Dvojití mutanti *rtell-1 nse4a-2* (1-3), kontrolní rostliny jednoduchých mutantů *nse4a-2* a *rtell-1* a Col-0 negativní kontrola. Měřítka = 1 cm.



Obrázek 19: PCR genotypování dvojitého mutantu *rtell-1 nse4a-2* na přítomnost *nse4a-2* inzertní alely.

Jamky 1 – 9 a 1 – 9 = jednotlivé vzorky. Jamky N, N a R, R = kontrolní linie jednoduchých mutantů (N, N = *nse4a-2* a R, R = *rtell-1*). C, C = negativní kontrola pro inzertní alelu (Col-0 rostlinná linie). Jamky bez podtržení byly testovány na přítomnost původní alely, jamky s podtržením byly testovány na přítomnost inzertní alely. M = marker molekulové hmotnosti, 1kb DNA ladder Plus. Pro PCR genotypování byly použity primery uvedené v Tabulce 6.

Dále byl sledován fenotyp dospělých rostlin dvojitých mutantů v porovnání s *nse4a-2* jednoduchým mutantem a negativní kontrolou Col-0, viz Obrázek 20. Na obrázku lze vidět, že rostliny dvojitých mutantů jsou oproti kontrolním rostlinám výrazně menší, a i přes svou malou velikost vytvořily již stonek a květ. Rostliny však mají výrazně sníženou fertilitu.



Obrázek 20: Fenotyp dospělých rostlin *rtell-1 nse4a-2* dvojitých mutantů v porovnání s *nse4a-2* jednoduchým mutantem a negativní kontrolou Col-0.

Měřítka = 1 cm.

5.2.5.2 Dvojití mutanti *rtell-1 hpy2-2*

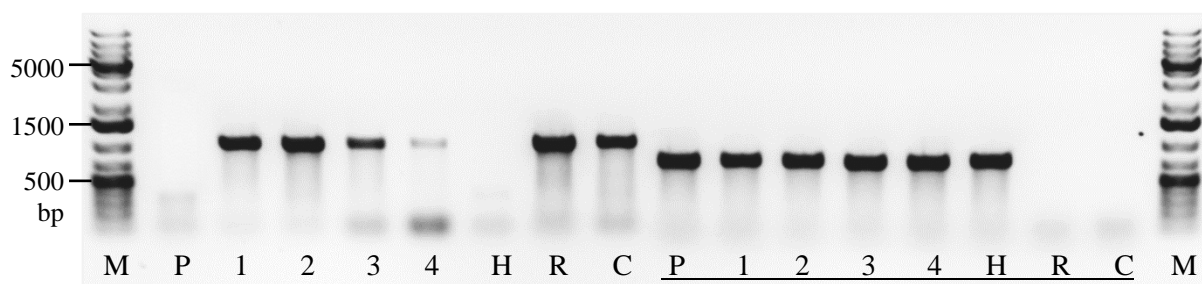
Pomocí PCR genotypování byly selektováni dvojití mutanti *rtell-1 hpy2-2*, viz Obrázek 21. Jednalo se o segregující populaci, z níž byly rostliny vybírány dle očekávaného zhoršeného fenotypu u dvojitých mutantů. Na obrázku lze vidět populaci rostlin, kdy určitá část není životaschopná, tyto rostliny byly vybrány jako kandidátní. PCR genotypování dvojitých mutantů bylo provedeno v jednom směsném vzorku (P) ze všech šesti kandidátů, viz Obrázek 22. To potvrdilo, že daný fenotyp odpovídal recesivním homozygotům.



Obrázek 21: Selektce dvojitě homozygotních mutantů *rtell-1 hpy2-2*.

P = směsný vzorek ze šesti kandidátních rostlin, 1 – 4 = předpokládáné heterozygotní rostliny.

Měřítka = 1 cm.



Obrázek 22: PCR genotypování dvojitého mutantu *rtell-1 hpy2-2* na přítomnost *hpy2-2* inzertní alely.

Jamky P, 1 – 4 a P, 1 – 4 = jednotlivé vzorky. Jamka H, H a R, R = kontrolní linie jednoduchých mutantů (H, H = *hpy2-2*, R, R = *rtell-1*), C, C = negativní kontrola pro inzertní alelu (Col-0 rostlinná linie). Jamky bez podržení = testované na přítomnost původní alely, s podržením = testované na přítomnost inzertní alely. M = marker molekulové hmotnosti, 1kb DNA ladder Plus. Pro PCR genotypování byly použity primery uvedené v Tabulce 6.



Obrázek 23: Předběžná genetická analýza procentuálního zastoupení dvojité homozygotních mutantů v populaci.

Kontrolní linie jednoduchých mutantů *hpy2-2* a *rtell-1* a negativní kontrola Col-0. Měřítka = 1 cm.

Vzhledem k fenotypu pozorovaného u dvojitých mutantů bylo očekáváno, že 25 % rostlin z populace dvojitých mutantů bude tomuto fenotypu odpovídat, výsledky jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10: Procentuální zastoupení letálních rostlin v populaci.

Rostlinné linie	Počet vysazených semen	Počet letálních jedinců	Zastoupení letálních jedinců v populaci [%]
<i>rtell-1 hpy2-2</i>	60	16	25
<i>hpy2-2</i>	21	2	9,5
<i>rtell-1</i>	21	0	0
Col-0	21	0	0

6 DISKUSE

Tato práce je zaměřena na identifikaci genů podílejících se na opravách DNA-proteinových crosslinků v DNA u huseníčku rolního. Pro výzkum však nebyl použit klasický přístup reverzní genetiky, ale naopak bylo využito dopředného genetického screenu. Dopředná genetika umožňuje identifikaci a analýzu nových genů za pomoci rozlišení změn v DNA řetězci, jež mají specifický fenotypový projev oproti negativní kontrole. Hlavním prvkem dopředné genetiky je mutagenizovaná populace rostlin, ze které jsou vybírány kandidátní rostliny. Díky tomuto přístupu z počátku není zapotřebí žádná informace o DNA sekvenci, ale pracuje se především s fenotypem kandidátů a jejich specifitou a citlivostí za různých podmínek (Alonso *et Ecker*, 2006). Následně je však zapotřebí identifikovat gen, který je za daný projev odpovědný a charakterizovat jeho funkci. Hlavní výhodou dopředného genetického screenu pak je, že mohou být objeveny naprosto nové, mnohdy neočekávané kandidátní geny.

Experimentální část mé diplomové práce úzce navazuje na výzkum Karin Krusky, jenž byl proveden v rámci její diplomové práce v roce 2017 v Max Planck Institute for Plant Breeding. Pro tento výzkum byla vytvořena EMS mutagenizovaná populace přibližně 10 000 semen rostliny *Arabidopsis thaliana*, linie W35, jež byla následně rozdělena do 108 skupin. EMS je alkylační činidlo, které způsobuje náhodné mutace v DNA pomocí substitucí nukleotidů, zejména pak alkylaci guaninu (Kruska, 2017). U mutagenizovaných rostlin *Arabidopsis thaliana* byl proveden screen pro identifikaci genů podílejících se na opravách DNA-proteinových crosslinků vyvolaných zebularinem. Zebularin je analogem cytidinu, a je tak schopen inkorporovat se do DNA řetězce, kde vytváří kovalentní vazbu mezi methyltransferázou 1 (MET1) a DNA řetězcem, čímž tvoří fyzickou bariéru pro enzymy zprostředkovávající replikaci a transkripci. U *Arabidopsis thaliana* bylo prokázáno, že zebularin indukuje odpověď na poškození DNA řetězce, které je nejlépe opravováno pomocí SDSA mechanismu homologní rekombinace (Liu *et al.*, 2015). Pokud kandidátní rostliny vykazují zvýšenou senzitivitu k zebularinu, je pravděpodobné, že gen, jenž je u rostlin vyřazen, bude zapojen do oprav DNA-proteinových crosslinků. Zatímco u negativní kontroly dochází na médiu se zebularinem ke zkrácení kořene přibližně o 30 %, kandidátní rostliny pak musí vykazovat na médiu se zebularinem zkrácení kořene alespoň o 60 % a zároveň se za normálních podmínek musí svou délkou kořene přibližovat k negativní kontrole. Takto dochází k vyřazení necitlivých kandidátů, a také rostlin se závažnými vývojovými vadami způsobenými EMS činidlem, které vykazují extrémní zkrácení kořene jak za normálních podmínek, tak i na médiu se zebularinem (Kruska, 2017). Při takové selekci však hraje roli i lidský faktor, kdy posouzení kandidátů nemusí být správné a může tak dojít i k vyřazení rostlin u nichž se daný fenotypový projev nachází.

V další fázi analýzy bylo využito techniky celogenomového sekvenování a následného mapování kandidátních lokusů. Díky tomu bylo možné potvrdit shodu fenotypu rostlin s konkrétní změnou v jejich genomové sekvenci, která byla odpovědná za jejich aberantní růst. Jedním z identifikovaných kandidátů byl *zes3-13* (zebularin enhancer screen, batch 3, kandidát 13) s mutací

v genu AT1G79950, kódující protein homologní k lidské helikáze RTEL1 – faktoru prodlužování telomer 1 (Kruska, 2017). Tento enzym hraje významnou roli při udržování genomové stability hned několika způsoby, jež jsou založeny především na odstraňování struktur podobných D-smyčkám v DNA. Díky tomuto mechanismu dokáže zpřístupnit telomery pro jejich replikaci, nebo takto zprostředkovává opravu DNA pomocí SDSA mechanismu homologní rekombinace (Hu *et al.*, 2015; Recker *et al.*, 2014). RTEL1 helikáza je dobře prozkoumaným enzymem u živočichů, kteří jsou na jeho funkci závislí. Příkladem lze uvést myši, které jsou v homozygotní konstituci s vyřazeným *RTEL1* genem letální (Ding *et al.*, 2004). U lidí vedou mutace v *RTEL1* genu ke vzniku Hoyeraal-Hreiderssonovu syndromu (Deng *et al.*, 2013), který je charakterizován krátkými telomery a nestabilitou genomu. Toto onemocnění vede ke vzniku vrozené predispozice k selhání kostní dřeně a vzniku rakoviny (Vannier *et al.*, 2014).

Hlavním cílem této práce byla analýza funkce a zapojení RTEL1 helikázy v mechanismech oprav DNA. Mutace genu *RTEL1* byla potvrzena jako kauzální mutace zodpovědná za zvýšenou senzitivitu kandidáta *zes3-13* k zebularinu. Pro pochopení mechanismu oprav DNA-proteinových crosslinků probíhala analýza funkce RTEL1 genu pomocí dvojitých mutantních linií s podjednotkami SMC5/6 komplexu, klíčového faktoru zapojeného v opravách DNA-proteinových crosslinků. Z časových důvodů jsem se zaměřila především na mutantní linii *rtell-1 smc6b-1*, u níž jsem se soustředila na fenotypové projevy spojené s vyšší mírou poškození DNA.

6.1 Analýza buněčné smrti v meristému kořene

Kořenová špička je rychle se replikující tkáň a pokud je replikace jakýmkoliv způsobem ovlivněna projeví se to změnou délky kořene, jeho architekturou a množstvím mrtvých buněk. Analýzou buněčné smrti v meristému kořene bylo zkoumáno, zda je možné, že se RTEL1 helikáza podílí na opravách DNA spojených s replikací obecně. Rostliny byly obarveny pomocí propidium jodidu, což je vitální barvivo, které barví buněčné stěny živých buněk, zatímco do mrtvých buněk vstupuje (Braná *et al.*, 2002). Rostliny dvojitých mutantů *rtell-1 smc6b-1* vykazovaly větší míru poškození, v kořenovém meristému těchto rostlin docházelo k odumírání většího počtu buněk, a také bylo pozorováno nápadné narušení kořenové architektury a zkrácení diferenciální zóny kořene. Dále došlo k nápadnému posunu zóny kořenového vlášení a jejich celkovému zkrácení oproti kontrolním rostlinám. Oba faktory, RTEL1 i SMC6B se podílejí na vývoji kořene a napomáhají k opravě aberantních replikačních struktur dvěma různými cestami. Ztráta synchronizovaného dělení buněk by navíc mohla být důvodem narušení architektury kořenového meristému.

Ve studii Recker *et al.*, 2014 bylo zkoumáno propojení RTEL1 helikázy a faktorů FANCM, REQ4A a MUS81. Tyto enzymy, podobně jako RTEL1, působí proti homologní rekombinaci a podílí se na rozebírání toxických meziproductů vznikajících v průběhu homologní rekombinace. U dvojitých mutantů *rtell-1 fancm-1* a *rtell-1 mus81-1* docházelo k podobně výraznému poškození kořenového meristému, což naznačuje, že je RTEL1 zapojen do zpracování DNA replikačních meziproductů nezávisle na FANCM a MUS81. Dvojití mutanti *rtell-1 recq4a-4* vykazovali natolik závažné vývojové

vady v kořenovém meristému, že nebylo možno analýzu provést. Obě helikázy pravděpodobně zpracovávají podobné typy replikačních meziproductů v drahách k sobě paralelních. Díky těmto poznatkům lze tedy říci, že existuje několik na sobě nezávislých cest pro odstranění toxických meziproductů replikace, které se mohou navzájem částečně nahrazovat či doplňovat. Naše data naznačují, že SMC5/6 komplex je v těchto drahách také zapojen, avšak jeho přesná funkce není prozatím jasná.

6.2 Analýza délky diferenciální zóny kořene

V této práci jsem se dále zaměřila na měření délky diferenciální zóny kořene jednotlivých rostlinných linií. U dvojitých mutantů došlo k výraznému zkrácení diferenciální zóny. Podobné hodnocení délky diferenciální zóny kořene rostlin *rtell-1* bylo provedeno ve studii Hu *et al.*, 2015. Snížení velikosti kořenového meristému korelovalo se snížením počtu dělicích se buněk, u nichž došlo ke kompenzačnímu zvětšení. Dále byla sledována diferenciální zóna u *rtell-1 wee1-1* a *rtell-1 atr-2* dvojitých mutantů. Kinázy ATR a WEE1 hrají roli ve spouštění odpovědi na DNA poškození. ATR reaguje zejména na zastavené replikační vidlice a jednovláknové struktury interferující s DNA replikací. Oproti tomu WEE1 kináza po přijetí signálu o DNA poškození zastavuje buněčný cyklus a vytváří tak prostor pro opravu DNA. Zkrácení diferenciální zóny se projevilo u jednoduchého mutantu *rtell-1* a u obou dvojitých mutantů. U rostlin deficientních na RTEL1 dochází ke zkrácení diferenciální zóny z důvodu defektní replikace DNA u dělicích se buněk. U dvojitých mutantů s ATR, popřípadě WEE kinázami, dochází k výraznému zkrácení diferenciální zóny z komplexnějšího důvodu. Kvůli vyřazení signálních kináz u rostlin dvojitých mutantů nedochází k odezvě na poškození DNA řetězce způsobené deficiencí RTEL1. U těchto rostlin proto nedocházelo k zastavení progresu buněčného cyklu a následné opravě DNA, což způsobovalo vznik synergických růstových defektů a zkrácení diferenciální zóny. Je tedy pravděpodobné, že pozorované zkrácení meristematické zóny u dvojitých mutantů *rtell-1 smc6b-1* je taktéž způsobeno poruchami v replikaci DNA a RTEL1 figuruje v paralelní dráze k SMC5/6 komplexu.

6.3 Analýza efektu mutace na somatický vývoj rostlin

Dvojití mutant *rtell-1 smc6b-1* vykazovali výrazné deformity listů a také došlo k nápadnému zmenšení celé rostliny. Výrazně zhoršený fenotypový projev *rtell-1 smc6b-1* dvojitého mutantu poukazuje na nezbytnost těchto dvou faktorů při zdravém vývoji rostlin. Výrazné zmenšení rostlin může poukazovat na nedostatečnou replikaci buněk z důvodu nahromadění neopravených lézí v DNA řetězci. Tyto defekty mohou být způsobeny zvýšením frekvence homologní rekombinace vzhledem k vyřazení genu *RTEL1*, kdy k hromadění lézí přispívá i vyřazení *SMC6B* genu, který se podílí na správném průběhu HR. Z těchto dat lze usuzovat, že se tyto geny uplatňují v paralelních drahách při somatickém vývoji rostlin.

Ve studii Hu *et al.*, 2015 zkoumali somatický vývoj *rtell-1 recq4a-4* mutantních rostlin. Dvojití mutant *rtell-1 recq4a-4* vykazovali silné deformace stonků a květů, a taktéž došlo k celkovému

zmenšení rostlin, což bylo přisuzováno synergické interakci mezi RTEL1 a RECQ4A faktory v růstu rostlin. Tato analýza ukazuje, že má *Arabidopsis thaliana* více faktorů zapojených v homologní rekombinaci a opravách DNA, které ovlivňují správný vývoj rostlin.

6.4 Analýza senzitivity na různá genotoxická činidla

Pro odhalení DNA-opravných drah, ve kterých je SMC5/6 komplex spolu s RTEL1 zapojen byly dvojité mutanti *rtell-1 smc6b-1* analyzovány na senzitivitu ke genotoxickým látkám způsobujícím různé druhy poškození DNA. Celkem bylo použito pět chemikálií: již zmíněné DNA-protein crosslinkující činidlo zebularin (Nowicka *et al.*, 2020), bleomycin vytvářející v DNA řetězci dvouvláknové zlomy (West *et al.*, 2004), MMC činidlo způsobující především interstrandové DNA crosslinky (Mannuss *et al.*, 2010b), CPT, inhibitor topoisomerasy I (Hartung *et al.*, 2008) a ICRF inhibitor topoisomerasy II (Węsierska-Gądek *et Składanowski*, 2012). U rostlin byl hodnocen úbytek celkové váhy rostlin oproti negativní kontrole, tedy rostlinám na médiu bez chemikálie. Při společném zapojení daných proteinů v opravách konkrétního poškození DNA byl u rostlin očekáván stejný fenotyp, zatímco pokud se účastní oprav DNA v různých drahách, pak by měl být fenotyp horší.

Při analýze senzitivity jednotlivých rostlinných linií k zebularinu byl detekován výrazný úbytek hmotnosti především u *smc6b-1* linie jednoduchých mutantů, kdy se jedná o linii extrémně senzitivní k zebularinu, a pak také u *rtell-1 smc6b-1* linie dvojitých mutantů. Vysoká senzitivita *smc6b-1* navíc odpovídá publikovaným datům, kdy mají *smc6b-1* rostliny vystavené zebularinu výrazně kratší kořeny (Liu *et al.*, 2015, Nowicka *et al.*, 2020). Rozlišení senzitivity těchto dvou rostlinných linií však není možné, což je způsobeno buď nedostatečným opakováním analýzy, působením těchto faktorů ve stejné dráze při opravách DNA-proteinových crosslinků, nebo zmíněnou extrémní citlivostí *smc6b-1* mutantní linie, která „maskuje“ zhoršený fenotyp dvojitých mutantů. Při analýze byla sledována také senzitivita *rtell-1* jednoduchého mutantu, která však mizí se snižující se koncentrací zebularinu a úbytek hmotnosti těchto rostlin byl výrazně menší oproti oběma již zmíněným liniím. Nižší senzitivita jednoduchého mutantu *rtell-1* může být v tomto případě způsobena pozdějším vývojovým stádiem rostlin, které jsou nejprve kultivovány sedm dní na růstovém médiu bez chemikálií a následně jsou přesunuty na médium s genotoxickým činidlem. Rostliny tak mají dostatek času na základní vývoj kořene a ostatních tkání. Efekt zebularinu na tuto linii lze nejlépe pozorovat v raných vývojových stádiích rostlin ve vysoce se replikujících tkáních, například při vývoji kořene. Na základě senzitivity *rtell-1* k zebularinu můžeme nicméně usuzovat, že je poškození vyvolané zebularinem opraveno dráhou homologní rekombinace.

Při kultivaci rostlin na médiu s bleomycinem byla detekována senzitivita především u mutantní linie *rtell-1 smc6b-1*. Senzitivita byla poté detekována také u mutantní linie *rtell-1*, avšak vzhledem k malým rozdílům mezi senzitivitou dvojitých mutantů *rtell-1 smc6b-1* a *rtell-1* linií jednoduchých mutantů, nelze jasně říct, zdali jsou geny *RTEL1* a *SMC6B* zapojeny v paralelních, či stejných drahách podílejících se na opravách zlomů v DNA řetězci. U živočichů bylo prokázáno, že je RTEL1 helikáza pro opravu DSB nezbytná (Barber *et al.*, 2008, Youds *et al.*, 2010). To, že je tato funkce konzervována z živočichů na rostliny, bylo potvrzeno zvýšenou senzitivitou na bleomycin u *rtell-1* mutantních rostlin

Physcomitrella patens (Goffová *et al.*, 2019, Kamisugi *et al.*, 2016). Avšak ve studii Hu *et al.*, 2015 byla sledována senzitivita *rtell-1* linie k zeocinu a bleomycinu u *Arabidopsis thaliana*. Obě uvedené látky vytvářejí v DNA řetězci dvojité zlomy. U rostlin deficitních na RTEL1 helikázu však senzitivita nebyla detekována. Kontrast analýzy senzitivity *rtell-1* linie k bleomycinu mnou uvedených výsledků a výsledků ze studie Hu *et al.*, 2015 lze vysvětlit rozdílnými podmínkami a dobou kultivace rostlin.

Při analýze senzitivity rostlin k MMC čidlu byla detekována senzitivita výhradně u rostlin dvojitých mutantů *rtell-1 smc6b-1*. Vzhledem k výrazné senzitivitě dvojitých mutantů je pravděpodobné, že se gen *RTEL1* i *SMC6B* významně podílí na opravách interstrandových crosslinků ve stejné dráze a u jednoduchých mutantů může při vyřazení jedno z genů docházet k vzájemné kompenzaci funkce. Zapojení RTEL1 helikázy do oprav interstrandových crosslinků studovali též Recker *et al.*, 2014. Zvýšená senzitivita *rtell-1* mutantů nebyla detekována, rostliny nicméně vykazovaly růstové defekty. Z tohoto důvodu byla zkoumána senzitivita k MMC u dvojitých mutantů *rtell-1 fancm-1* a *rtell-1 mus81-1* a u dvojitého mutantu *rtell-1 fancm-1* byla potvrzena. U mutantní linie *mus81-1* byla přecitlivělost k MMC známá již ze studie Hartung *et al.*, 2006. Senzitivita dvojitého mutantu po ošetření MMC byla srovnatelná s mutantní linií *mus81-1*. RTEL1 tedy působí v paralelní dráze s FANCM helikázou, a zároveň působí ve stejné dráze s MUS81 endonukleázou. Tyto výsledky potvrzují, že se RTEL1 helikáza oprav DNA interstrandových crosslinků účastní. Na opravě tohoto poškození se však podílí více na sobě nezávislých drah, kdy se neúčinnost mechanismu oprav projeví až při vyřazení dvou a více faktorů, jelikož je ztráta jedné cesty kompenzována alternativní cestou.

CPT stejně jako zebularin vytváří v DNA řetězci DNA-proteinové crosslinky. Při použití CPT však nebyla senzitivita rostlin detekována. Tento výsledek je zřejmě zapříčiněn volbou nedostatečně vysokých koncentrací tohoto čidla, kdy se senzitivita neprojevila u žádné z použitých rostlinných linií. Senzitivita *rtell-1* mutantní linie vůči CPT byla již testována a potvrzena ve studii Hu *et al.*, 2015, avšak s vyššími koncentracemi chemikálie.

ICRF čidlo podobně jako zebularin a CPT vytváří v DNA řetězci DNA-proteinové crosslinky. ICRF čidlo působilo nejvýrazněji na linii dvojitých mutantů *rtell-1 smc6b-1*. U linií jednoduchých mutantů nebyla senzitivita detekována, z čehož lze vyvozovat, že RTEL1 a SMC6B faktory hrají při opravách DNA-proteinových crosslinků způsobených inhibicí topoisomerázy II na DNA řetězci významnou úlohu v paralelních drahách, které se vzájemně nahrazují v případě ztráty jedno z faktorů.

Závěrem této analýzy lze uvést, že se RTEL1 helikáza společně s SMC6B faktorem podílí na opravách DNA-proteinových crosslinků vyvolaných jak zebularinem tak i ICRF. V případě zebularinu není zcela jasné, zdali tyto dva geny působí ve stejných nebo paralelních drahách, oproti tomu u ICRF je jasné, že se dráhy navzájem doplňují a jsou k sobě paralelní. Zvýšená senzitivita dvojitých mutantů na MMC poté potvrzuje zapojení RTEL1 a SMC6B faktorů do oprav interstrandových crosslinků v DNA. Tento výsledek tedy podporuje roli daných faktorů v homologní rekombinaci. Je však jasné, že rostliny používají různé faktory k řešení odlišných typů DNA struktur.

Vzhledem k tomu, že byl z časových důvodů experiment realizován pouze ve dvou biologických replikátech, bylo vyhodnocení této analýzy velmi obtížné. Další opakování této analýzy jsou předmětem budoucích studií, kdy dojde i k úpravám koncentrací.

6.5 Interakce RTEL1 a SMC6B

Díky analýzám provedených v rámci této práce lze potvrdit, že RTEL1 helikáza hraje u *Arabidopsis thaliana* při udržování genomové stability více rolí. RTEL1 helikáza se zapojuje do oprav DNA-proteinových crosslinků, dvojitých zlomů v DNA řetězci i interstrandových crosslinků v DNA. Dále RTEL1 pracuje v paralelních drahách k helikáze FANCM a RECQ4A, což ukazuje, že *Arabidopsis* má alespoň tři nesouvisející DNA helikázy s funkcí antirekombinázy (Hu *et al.*, 2015; Recker *et al.*, 2014). Do oprav spojených s homologní rekombinací je zapojen také faktor SMC6B, který je dle předchozích dat obzvláště důležitý při opravách DNA-proteinových crosslinků. SMC5/6 komplex, v němž hraje *SMC6B* gen zásadní úlohu, reguluje u rostlin specifické vývojové procesy zahrnující vývoj meristému, kmenových buněk, květu a semen (Diaz *et Pecinka*, 2018). RTEL1 i SMC6B se dle předchozích dat podílejí na vývoji kořene, kde napomáhají k opravě aberantních replikačních struktur dvěma různými cestami. Oba faktory se navíc podílejí na správném somatickém vývoji rostlin, kdy pravděpodobně působí v různých drahách, jež jsou odpovědné za normální růst rostlin. RTEL1 i SMC6B jsou poté, stejně jako RECQ4A, zásadní pro správnou replikaci buněk u *Arabidopsis thaliana*. Pokud tyto proteiny nejsou v dělicích se buňkách přítomny dochází k zablokování replikačních vidlic neopravenými lézemi v DNA, čímž může docházet ke zpoždění buněčného cyklu. Ztráta synchronizace během buněčného dělení pak může vést k neobvyklé architektuře kořenového meristému, kterou lze pozorovat především u rostlin dvojitých mutantů a pokud k opravení lézí nedojde, buňky u těchto rostlin odumírají. Zkrácení diferenciální zóny v kořenech postižených rostlin pak lze vysvětlit nedostatečným množstvím normálně se dělicích buněk, které je kompenzováno zkrácením diferenciální zóny a prodloužením buněk stávajících. Z toho vyplývá, že jsou oba proteiny u rostlin klíčové pro jejich vývoj a správný metabolismus DNA.

7 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce byla analýza funkce a zapojení RTEL1 helicázy v mechanismech oprav DNA a genetické interakci s SMC5/6 komplexem. Ústředním krokem k této analýze byla validace kandidátní linie *zes3-13* a poté samotná analýza fenotypu pomocí dvojitých mutantů s podjednotkami SMC5/6 komplexu. Z časových důvodů jsem se následně zaměřila především na mutantní linii *rtell-1 smc6b-1*. Klíčovými experimenty s dvojitými mutanty byly zejména analýza buněčné smrti v kořenovém meristému, měření délky diferenciální zóny kořene, analýza efektu mutace na somatický vývoj rostlin a také analýza senzitivity dvojitých mutantů ke genotoxickým látkám.

DNA-proteinových crosslinky jsou jedno z nejtoxičtějších a zároveň nejméně prozkoumaných DNA poškození u rostlin, kdy poznatky z experimentální části této práce přispěly k identifikaci genů podílejících se na opravách tohoto poškození u *Arabidopsis thaliana*. V této práci byla potvrzena klíčová role RTEL1 helicázy a SMC6B faktoru v mechanismech oprav DNA-proteinových cross-linků. Dále bylo zjištěno, že se tyto faktory se společně podílejí na vývoji kořene, kde pravděpodobně napomáhají k opravě aberantních replikačních struktur dvěma různými cestami. Oba faktory se navíc podílejí na správném somatickém vývoji rostlin, kdy zřejmě působí v paralelních drahách, jež jsou odpovědné za normální růst rostlin. Z toho vyplývá, že jsou oba faktory u rostlin klíčové pro jejich správný vývoj a metabolismus DNA.

Podrobnějších výzkum mechanismů oprav DNA je velmi zajímavý, jelikož existují vztahy mezi mechanismy DNA oprav u rostlin a člověka. Identifikace genů pro opravy DNA-proteinových crosslinků a analýza jejich funkce by proto mohla zlepšit porozumění metabolismu DNA a zachování integrity genomu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adamus M., Lelkes E., Potesil D., Ganji S. R., Kolesar P., Zabradý K., Zdrahal Z. *et* Palecek J. J. (2020). Molecular Insights into the Architecture of the Human SMC5/6 Complex. *Journal of Molecular Biology*, 432(13), 3820–3837.
- Alabert C. *et* Groth A. (2012). Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(3), 153–167.
- Alonso J. M. *et* Ecker, J. R. (2006). Moving forward in reverse: Genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in Arabidopsis. *Nature Reviews Genetics*, 7(7), 524–536.
- Aragón L. (2018). The Smc5/6 Complex: New and Old Functions of the Enigmatic Long-Distance Relative. *Annual Review of Genetics*, 52(1), 89–107.
- Bagherieh-Najjar M. B. (2003). ArabidopsisRecQsim, a plant-specific member of the RecQ helicase family, can suppress the MMS hypersensitivity of the yeast sgs1 mutant. *Plant Molecular Biology*,
- Barber L. J., Youds J. L., Ward J. D., McIlwraith M. J., O’Neil N. J., Petalcorin M. I. R., Martin J. S., Collis S. J., Cantor S. B., Auclair M., Tissenbaum H., West S. C., Rose A. M. *et* Boulton S. J. (2008). RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination. *Cell*, 135(2), 261–271.
- Baumann P. *et* West S. C. (1998). Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(7), 247–251.
- Bleuyard J.-Y., Gallego M. E., Savigny F. *et* White C. I. (2004). Differing requirements for the Arabidopsis Rad51 paralogs in meiosis and DNA repair: Roles of Arabidopsis Rad51 paralogs. *The Plant Journal*, 41(4), 533–545.
- Brana C., Benham C. *et* Sundstrom L. (2002). A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. *Brain Research Protocols*, 10(2), 109–114.
- Branzei D. *et* Foiani M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), 297–308.
- Burma S., Chen B. P. C. *et* Chen D. J. (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair*, 5(9–10), 1042–1048.
- Canturk F., Karaman M., Selby C. P., Kemp M. G., Kulaksiz-Erkmen G., Hu J., Li W., Lindsey-Boltz L. A. *et* Sancar A. (2016). Nucleotide excision repair by dual incisions in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(17), 4706–4710.
- Cooper G. M. (2000). *The cell: A molecular approach* (2. ed). ASM Press.

- Dalhus B., Laerdahl J. K., Backe P. H. et Bjørås M. (2009). DNA base repair – recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(6), 1044–1078.
- Dangel N. J., Knoll A. et Puchta H. (2014). MHF 1 plays Fanconi anaemia complementation group M protein (FANCM)-dependent and FANCM – independent roles in DNA repair and homologous recombination in plants. *The Plant Journal*, 78(5), 822–833.
- Davis A. J. et Chen D. J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational Cancer Research*, 2(3), 130–143.
- Deans A. J. et West S. C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(7), 467–480.
- de Laat W. L., Jaspers N. G. J. et Hoeijmakers J. H. J. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes et Development*, 13(7), 768–785.
- Deng Z., Glusker G., Molczan A., Fox A. J., Lamm N., Dheekollu J., Weizman O.-E., Schertzer M., Wang Z., Vladimirova O., Schug J., Aker M., Londoño-Vallejo A., Kaestner K. H., Lieberman P. M. et Tzfati Y. (2013). Inherited mutations in the helicase RTEL1 cause telomere dysfunction and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(36), E3408-E3416.
- Dianov G. L. et Hübscher U. (2013). Mammalian Base Excision Repair: The Forgotten Archangel. *Nucleic Acids Research*, 41(6), 3483–3490.
- Diaz M. et Pecinka A. (2018). Scaffolding for Repair: Understanding Molecular Functions of the SMC5/6 Complex. *Genes*, 9(1), 36.
- Díaz M., Pečinková P., Nowicka A., Baroux C., Sakamoto T., Gandha P. Y., Jeřábková H., Matsunaga S., Grossniklaus U. et Pecinka, A. (2019). The SMC5/6 Complex Subunit NSE4A Is Involved in DNA Damage Repair and Seed Development. *The Plant Cell*, 31(7), 1579–1597.
- Ding H., Schertzer M., Wu X., Gertsenstein M., Selig S., Kammori M., Pourvali R., Poon S., Vulto I., Chavez E., Tam P. P. L., Nagy A. et Lansdorp P. M. (2004). Regulation of Murine Telomere Length by Rtel. *Cell*, 117(7), 873–886.
- Dorn A., Feller L., Castri D., Röhrig S., Enderle J., Herrmann N. J., Block-Schmidt A., Trapp O., Köhler L. et Puchta H. (2019). An Arabidopsis FANCI helicase homologue is required for DNA crosslink repair and rDNA repeat stability. *PLOS Genetics*, 15(5), e1008174.
- Dorn A. et Puchta H. (2019). DNA Helicases as Safekeepers of Genome Stability in Plants. *Genes*, 10(12), 1028.

- Drabløs F., Feyzi E., Aas P. A., Vaagbø C. B., Kavli B., Bratlie M. S., Peña-Díaz J., Otterlei M., Slupphaug G. et Krokan H. E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*, 3(11), 1389–1407.
- Dronkert M. L. G. et Kanaar R. (2001). Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research/DNA Repair*, 486(4), 217–247.
- Enderle J., Dorn A. et Puchta, H. (2019). DNA- and DNA-Protein-Crosslink Repair in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4304.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage), Gedik C. M. et Collins A. (2005). Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: Results of an interlaboratory validation study. *The FASEB Journal*, 19(1), 82–84.
- Essers, J. (2000). Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. *The EMBO Journal*, 19(7), 1703–1710.
- Freifelder D. et Trumbo B. (1969). Matching of single-strand breaks to form double-strand breaks in DNA. *Biopolymers*, 7(5), 681–693.
- Fujioka Y., Kimata Y., Nomaguchi K., Watanabe K. et Kohno K. (2002). Identification of a Novel Non-structural Maintenance of Chromosomes (SMC) Component of the SMC5-SMC6 Complex Involved in DNA Repair. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21585–21591.
- Gallego M. E., Bleuyard J.-Y., Daoudal-Cotterell S., Jallut N. et White C. I. (2003). Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in *Arabidopsis*: *Arabidopsis Ku80 roles in recombination*. *The Plant Journal*, 35(5), 557–565.
- Goffová I., Vágnerová R., Peška V., Franek M., Havlová K., Holá M., Zachová D., Fojtová M., Cuming A., Kamisugi Y., Angelis K. J. et Fajkus J. (2019). Roles of RAD 51 and RTEL 1 in telomere and rDNA stability in *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*.
- Gorbunova V. (1997). Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4650–4657.
- Hacker L., Dorn A. et Puchta H. (2020). Repair of DNA-protein crosslinks in plants. *DNA Repair*, 87.
- Haering C. H. et Gruber, S. (2016). SnapShot: SMC Protein Complexes Part I. *Cell*, 164(1–2), 326–326.
- Haering C. H., Löwe J., Hochwagen A. et Nasmyth K. (2002). Molecular Architecture of SMC Proteins and the Yeast Cohesin Complex. *Molecular Cell*, 9(4), 773–788.
- Harfe B. D. et Jinks-Robertson S. (2000). DNA Mismatch Repair and Genetic Instability. *Annual Review of Genetics*, 34(1), 359–399.

- Hartung F. *et* Puchta H. (2006). The RecQ gene family in plants. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 287–296.
- Hartung F., Suer S., Knoll A., Wurz-Wildersinn R. *et* Puchta H. (2008). Topoisomerase 3 α and RMI1 Suppress Somatic Crossovers and Are Essential for Resolution of Meiotic Recombination Intermediates in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 4(12).
- Hassler M., Shaltiel I. A. *et* Haering C. H. (2018). Towards a Unified Model of SMC Complex Function. *Current Biology*, 28(21), R1266–R1281.
- Helleday T. (2003). Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 532(1–2), 103–115.
- Herrmann N. J., Knoll A. *et* Puchta H. (2015). The nuclease FAN1 is involved in DNA crosslink repair in *Arabidopsis thaliana* independently of the nuclease MUS81. *Nucleic Acids Research*, 43(7), 3653–3666.
- Hu Z., Cools T., Kalhorzadeh P., Heyman J., *et* De Veylder L. (2015). Deficiency of the *Arabidopsis* Helicase RTEL1 Triggers a SOG1-Dependent Replication Checkpoint in Response to DNA Cross-Links. *The Plant Cell*, 27(1), 149–161.
- Chatterjee N., *et* Walker G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis: DNA Damage and Repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235–263.
- Chu W. K., *et* Hickson I. D. (2009). RecQ helicases: Multifunctional genome caretakers. *Nature Reviews Cancer*, 9(9), 644–654.
- Ishida T., Fujiwara S., Miura K., Stacey N., Yoshimura M., Schneider K., Adachi S., Minamisawa K., Umeda M. *et* Sugimoto K. (2009). SUMO E3 Ligase HIGH PLOIDY2 Regulates Endocycle Onset and Meristem Maintenance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(8), 2284–2297.
- Jasin M., *et* Rothstein R. (2013). Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11).
- Kamisugi Y., Whitaker J. W. *et* Cuming A. C. (2016). The Transcriptional Response to DNA Double-Strand Breaks in *Physcomitrella patens*. *PLOS ONE*, 11(8).
- Kanno T., Berta D. G. *et* Sjögren C. (2015). The Smc5/6 Complex Is an ATP-Dependent Intermolecular DNA Linker. *Cell Reports*, 12(9), 1471–1482.
- Karpenshif Y. *et* Bernstein K. A. (2012). From yeast to mammals: Recent advances in genetic control of homologous recombination. *DNA Repair*, 11(10), 781–788.
- Khanna K. K. *et* Jackson S. P. (2001). DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27(3), 247–254.

- Khoronenkova S. V. *et Dianov G. L.* (2015). ATM prevents DSB formation by coordinating SSB repair and cell cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(13), 3997–4002.
- Kim H. *et D'Andrea A. D.* (2012). Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes et Development*, 26(13), 1393–1408.
- Kimura S. *et Sakaguchi K.* (2006). DNA Repair in Plants. *Chemical Reviews*, 106(2), 753–766.
- Klages-Mundt N. L. *et Li L.* (2017). Formation and repair of DNA-protein crosslink damage. *Science China Life Sciences*, 60(10), 1065–1076.
- Knoll A. *et Puchta H.* (2011). The role of DNA helicases and their interaction partners in genome stability and meiotic recombination in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1565–1579.
- Knoll A., Fauser F. *et Puchta H.* (2014). DNA recombination in somatic plant cells: Mechanisms and evolutionary consequences. *Chromosome Research*, 22(2), 191–201.
- Kolodner R. D. *et Marsischky G. T.* (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinion in Genetics et Development*, 9(1), 89–96.
- Krogh B. O. *et Symington L. S.* (2004). Recombination Proteins in Yeast. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 233–271.
- Krokan H. E. *et Bjoras M.* (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4).
- Krokan H. E., Standal R. *et Slupphaug G.* (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochemical Journal*, 325(1), 1–16.
- Kruska K. (2017). Forward genetic screen to identify genes involved in repair of zebularine induced DNA damage. Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung.
- Kunkel T. A. *et Erie D. A.* (2005). DNA MISMATCH REPAIR. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 681–710.
- Kwak J. S., Son G. H., Kim S. I., Song J. T. *et Seo H. S.* (2016). Arabidopsis HIGH PLOIDY2 Sumoylates and Stabilizes Flowering Locus C through Its E3 Ligase Activity. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Li G., Zou W., Jian L., Qian J., Deng Y. *et Zhao J.* (2017). Non-SMC elements 1 and 3 are required for early embryo and seedling development in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 68(5), 1039–1054.
- Li G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18(1), 85–98.
- Li X. *et Heyer, W. D.* (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, 18(1), 99–113.

- Lindahl T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709–715.
- Liu C. H., Finke A., Díaz M., Rozhon W., Poppenberger B., Baubec T. et Pecinka, A. (2015). Repair of DNA Damage Induced by the Cytidine Analog Zebularine Requires ATR and ATM in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 27(6), 1788–1800.
- Liu M., Shi S., Zhang S., Xu P., Lai J., Liu Y., Yuan D., Wang Y., Du J. et Yang C. (2014). SUMO E3 ligase AtMMS21 is required for normal meiosis and gametophyte development in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 14(1), 153.
- Liu Z., Hossain G. S., Islas-Osuna M. A., Mitchell D. L. et Mount D. W. (2000). Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: Arabidopsis UVH1 DNA repair gene is a homolog of Saccharomyces cerevisiae Rad1: DNA repair endonuclease from Arabidopsis. *The Plant Journal*, 21(6), 519–528.
- Lloyd A. H., Wang D. et Timmis J. N. (2012). Single Molecule PCR Reveals Similar Patterns of Non-Homologous DSB Repair in Tobacco and Arabidopsis. *PLoS ONE*, 7(2).
- London T. B. C., Barber L. J., Mosedale G., Kelly G. P., Balasubramanian S., Hickson I. D., Boulton S. J. et Hiom K. (2008). FANCD1 Is a Structure-specific DNA Helicase Associated with the Maintenance of Genomic G/C Tracts. *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36132–36139.
- Losada A. (2005). Dynamic molecular linkers of the genome: The first decade of SMC proteins. *Genes et Development*, 19(11), 1269–1287.
- Mannuss A., Dukowic-Schulze S., Suer S., Hartung F., Pacher M. et 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(10), 3318–3330.
- Maple J. et Møller S. G. (2007). Mutagenesis in Arabidopsis. In E. Rosato (Ed.), *Circadian Rhythms* (Roč. 362, s. 197–206). Humana Press.
- Moustacchi E. (2000). DNA damage and repair: Consequences on dose-responses. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 464(1), 35–40.
- Nepal M., Che R., Zhang J., Ma C. et Fei P. (2017). Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends in Cancer*, 3(12), 840–856.
- Nowicka A., Tokarz B., Zwyrtková J., Dvořák Tomašítková E., Procházková K., Ercan U., Finke A., Rozhon W., Poppenberger B., Otmar M., Niezgodzki I., Krečmerová M., Schubert I. et Pecinka A. (2020). Comparative analysis of epigenetic inhibitors reveals different degrees of interference with transcriptional gene silencing and induction of DNA damage. *The Plant Journal*, 102(1), 68–84.
- Olivier M., Charbonnel C., Amiard S., White C. I. et Gallego M. E. (2018). RAD51 and RTEL1 compensate telomere loss in the absence of telomerase. *Nucleic Acids Research*, 46(5), 2432–2445.

- Palecek J. J. *et* Gruber S. (2015). Kite Proteins: A Superfamily of SMC/Kleisin Partners Conserved Across Bacteria, Archaea, and Eukaryotes. *Structure*, 23(12), 2183–2190.
- Palecek J., Vidot S., Feng M., Doherty A. J. *et* Lehmann A. R. (2006). The Smc5-Smc6 DNA Repair Complex: BRIDGING OF THE Smc5-Smc6 HEADS BY THE KLEISIN, Nse4, AND NON-KLEISIN SUBUNITS. *Journal of Biological Chemistry*, 281(48), 36952–36959.
- Potts P. R. *et* Yu H. (2005). Human MMS21/NSE2 Is a SUMO Ligase Required for DNA Repair. *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), 7021–7032.
- Procházková Schruppřová P., Fojtová M. *et* Fajkus J. (2019). Telomeres in Plants and Humans: Not So Different, Not So Similar. *Cells*, 8(1), 58.
- Puchta H. (1998). Repair of genomic double-strand breaks in somatic plant cells by one-sided invasion of homologous sequences. *The Plant Journal*, 13(3), 331–339.
- Rana V. *et* Bosco G. (2017). Condensin Regulation of Genome Architecture: CONDENSIN REGULATION OF GENOME ARCHITECTURE. *Journal of Cellular Physiology*, 232(7), 1617–1625.
- Raschle M., Smeenk G., Hansen R. K., Temu T., Oka Y., Hein M. Y., Nagaraj N., Long D. T., Walter J. C., Hofmann K., Storchova Z., Cox J., Bekker-Jensen S., Mailand N. *et* Mann M. (2015). Proteomics reveals dynamic assembly of repair complexes during bypass of DNA cross-links. *Science*, 348(6234).
- Reardon J. T. *et* Sancar A. (2005). Nucleotide Excision Repair. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Roč. 79, s. 183–235). Elsevier.
- Recker J., Knoll A. *et* Puchta H. (2014). The *Arabidopsis thaliana* Homolog of the Helicase RTEL1 Plays Multiple Roles in Preserving Genome Stability. *The Plant Cell*, 26(12), 4889–4902.
- Regairaz M., Zhang Y.-W., Fu H., Agama K. K., Tata N., Agrawal S., Aladjem M. I. *et* Pommier Y. (2011). Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I–DNA complexes. *Journal of Cell Biology*, 195(5), 739–749.
- Riha K. (2001). Living with Genome Instability: Plant Responses to Telomere Dysfunction. *Science*, 291(5509), 1797–1800.
- Röhrig S., Schröpfer S., Knoll A., *et* 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(10).
- Roldán-Arjona T., Ariza R. R. *et* Córdoba-Cañero D. (2019). DNA Base Excision Repair in Plants: An Unfolding Story With Familiar and Novel Characters. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1055.
- Rouse J. (2002). Interfaces Between the Detection, Signaling, and Repair of DNA Damage. *Science*, 297(5581), 547–551.

- Růčková E., Friml J., Procházková Schrupfová P. *et* Fajkus J. (2008). Role of alternative telomere lengthening unmasked in telomerase knock-out mutant plants. *Plant Molecular Biology*, 66(6), 637–646.
- Rytz T. C., Miller M. J., McLoughlin F., Augustine R. C., Marshall R. S., Juan Y., Charng Y., Scalf M., Smith L. M. *et* Vierstra R. D. (2018). SUMOylome Profiling Reveals a Diverse Array of Nuclear Targets Modified by the SUMO Ligase SIZ1 during Heat Stress. *The Plant Cell*, 30(5), 1077–1099.
- Seeberg E., Eide L. *et* Bjørås M. (1995). The base excision repair pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(10), 391–397.
- Sergeant J., Taylor E., Palecek J., Foustari M., Andrews E. A., Sweeney S., Shinagawa H., Watts F. Z. *et* Lehmann A. R. (2005). Composition and Architecture of the Schizosaccharomyces pombe Rad18 (Smc5-6) Complex. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1), 172–184.
- Scharer O. D. (2013). Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(10).
- Siebert R. *et* Puchta H. (2002). Efficient Repair of Genomic Double-Strand Breaks by Homologous Recombination between Directly Repeated Sequences in the Plant Genome. *The Plant Cell*, 14(5), 1121–1131.
- Sparks J. L., Chistol G., Gao A. O., Räschle M., Larsen N. B., Mann M., Duxin J. P. *et* Walter J. C. (2019). The CMG Helicase Bypasses DNA-Protein Cross-Links to Facilitate Their Repair. *Cell*, 176.
- Stingle J., Bellelli R. *et* Boulton S. J. (2017). Mechanisms of DNA–protein crosslink repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(9), 563–573.
- Stingle J., *et* Jentsch S. (2015). DNA–protein crosslink repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(8), 455–460.
- Stingle J., Schwarz M. S., Bloemeke N., Wolf P. G. *et* Jentsch S. (2014). A DNA-Dependent Protease Involved in DNA-Protein Crosslink Repair. *Cell*, 158(2), 327–338.
- Suhasini A. N. *et* Brosh R. M. (2013). DNA Helicases Associated with Genetic Instability, Cancer, and Aging. *DNA Helicases and DNA Motor Proteins* (Roč. 767, s. 123–144). Springer New York.
- Tuteja N. (2003). Plant DNA helicases: The long unwinding road. *Journal of Experimental Botany*, 54(391), 2201–2214.
- Uhlmann F. (2016). SMC complexes: From DNA to chromosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(7), 399–412.
- Uringa E.-J., Youds J. L., Lisaingo K., Lansdorp P. M. *et* Boulton S. J. (2011). RTEL1: An essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, 39(5), 1647–1655.

- van Gent, D. C. *et* van der Burg M. (2007). Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene*, 26(56), 7731–7740.
- Vannier J.-B., Sarek G. *et* Boulton S. J. (2014). RTEL1: Functions of a disease-associated helicase. *Trends in Cell Biology*, 24(7), 416–425.
- Wang J. C. (1996). DNA Topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 635–692.
- Watanabe K., Pacher M., Dukowic S., Schubert V., Puchta H. *et* Schubert I. (2009). The STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 5/6 Complex Promotes Sister Chromatid Alignment and Homologous Recombination after DNA Damage in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21(9), 2688-2699.
- Węsierska-Gądek J. *et* Składanowski A. (2012). Therapeutic intervention by the simultaneous inhibition of DNA repair and type I or type II DNA topoisomerases: One strategy, many outcomes. *Future Medicinal Chemistry*, 4(1), 51–72.
- West C. E., Waterworth W. M., Sunderland P. A. *et* Bray C. M. (2004). Arabidopsis DNA double-strand break repair pathways. *Biochemical Society Transactions*, 32(6), 964–966.
- Wood R. D. (1997). Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23465–23468.
- Wu S.-Y. (2003). Dissimilar mispair-recognition spectra of Arabidopsis DNA-mismatch-repair proteins MSH2-MSH6 (MutS) and MSH2-MSH7 (MutS). *Nucleic Acids Research*, 31(20), 6027–6034.
- Yan S., Wang W., Marqués J., Mohan R., Saleh A., Durrant W. E., Song J. *et* Dong X. (2013). Salicylic Acid Activates DNA Damage Responses to Potentiate Plant Immunity. *Molecular Cell*, 52(4), 602–610.
- Youds J. L., Mets D. G., McIlwraith M. J., Martin J. S., Ward J. D., O'Neil N. J., Rose A. M., West S. C., Meyer B. J. *et* Boulton S. J. (2010). RTEL-1 Enforces Meiotic Crossover Interference and Homeostasis. *Science*, 327(5970), 1254–1258.
- Zharkov D. O. (2008). Base excision DNA repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(10), 1544-1565.

9 Přílohy

Příloha 1: Oligonukleotidy použité při amplifikaci jednotlivých lokusů.

Příloha 2: Plakátové sdělení z konference 11th Central European Genome Stability meeting, Szeged, Maďarsko, 23. 3. 2021

Příloha 1: Oligonukleotidy použité při amplifikaci jednotlivých lokusů.

Název primeru	Sekvence
gRTEL2-F	5' GGGTTACCAAACGATTATAC 3'
gRTEL2-R	5' CGACACAGAATATAAAGAACA 3'
ET0035	5' AGCTTCAACGTGAAATCATGG 3'
ET0036	5' CTAGACAACATGTCATACCGGG 3'
nse4a-2_F	5' GCTCAACAGGCGGTCATTTG 3'
nse4a-2_R	5' ACAAAGCCACTTAACTGCTACA 3'
HPY2-2_F	5' TGTCTGCTCTTGCCAACACT 3'
HPY2-2_R	5' ATCGTCACCAGGCATTGGTT 3'
LB_AP1	5' ACTGGAACAACACTCAACCCTATCT 3'
o84748m	5' ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT 3'
SAIL_LB2m	5' TAGCATCTGAATTTTCATAACCAAT 3'
MMS21-2_R	5' ACATTCCAAACTGCTTCCCTGA 3'
ET0131	5' AAGGACTGCTGATATTTTCC 3'
ET0151	5' GTCAGCGAAGGACTGGATTT 3'
ET0152	5' CTTGACGTTAGGTCGTATCCA 3'
3_13 uniR1	5' TTCATGCACTATCTATTCGC 3'

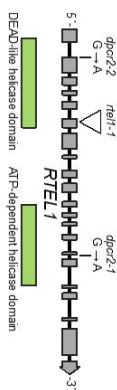
RTEL1 helicase and SMC5/6 complex act in parallel pathways in DNA protein crosslink repair

Eva Dvořák Tomášíková*, Veronika Kašková, Aleš Pečínka*

Institute of Experimental Botany (IEB), Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research (CRH), Olomouc, Czech Republic, *pecinka@ueb.cas.cz

Introduction

REDUCED TELOMERE LENGTHENING 1 (RTEL1) is an ATP-dependent DNA helicase that participates in DNA replication, telomere maintenance and DNA damage repair by suppressing homologous recombination through disassembling D-loop replication intermediates. We have identified RTEL1 in a forward-directed genetic screen seeking for proteins involved in zebularine-induced DNA-protein crosslink (DPC) repair in *Arabidopsis thaliana*. Moreover, we describe its genetic interaction with SMC5/6 complex.

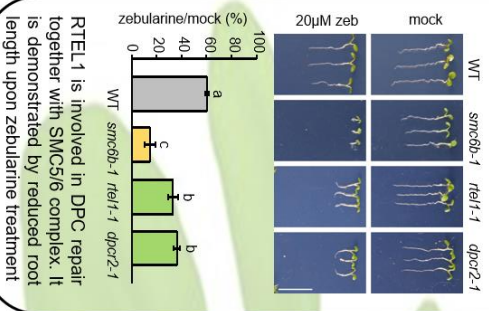


Institute of Experimental Botany of the AS CR, v. v. i.

C. R. HAVANA



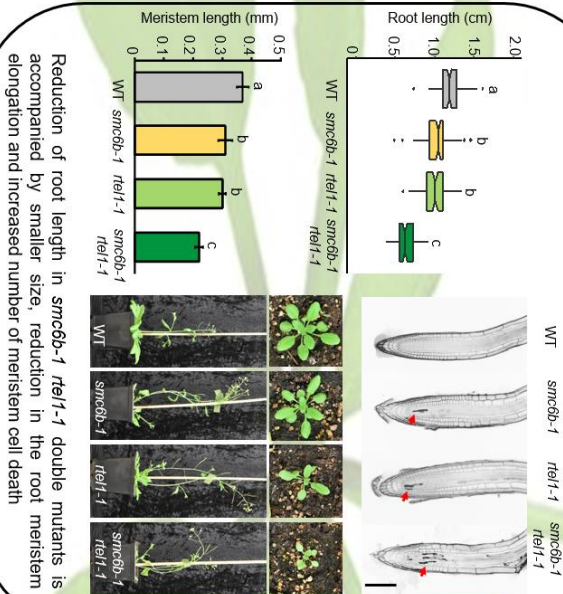
RTEL1 repairs zebularine-induced DPCs



RTEL1 is involved in DPC repair together with SMC5/6 complex. It is demonstrated by reduced root length upon zebularine treatment

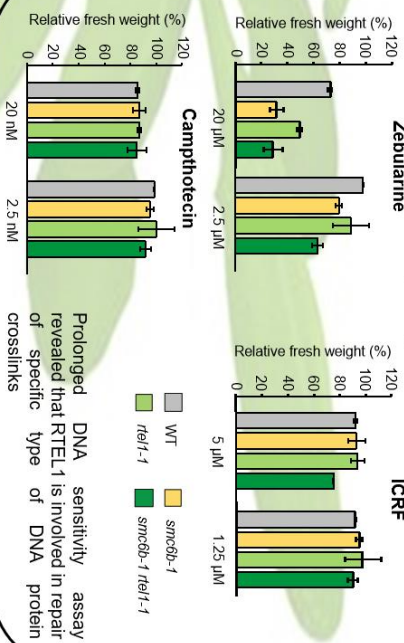
This work was supported from grants nr. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/00000027 and 19-13848S.

RTEL1 genetically interacts with SMC5/6 complex



Reduction of root length in smc5b-1 rtel1-1 double mutants is accompanied by smaller size, reduction in the root meristem elongation and increased number of meristem cell death

RTEL1 and SMC5/6 repairs DNA protein crosslinks in parallel pathways



Prolonged DNA sensitivity assay revealed that RTEL1 is involved in repair of specific type of DNA crosslinks

Conclusion

Here, we show that RTEL1 is involved in the repair of zebularine-induced DNA protein crosslinks. Moreover, genetic interaction with SMC5/6 complex revealed importance of both factors for proper root meristem development. We show that RTEL1 and SMC5/6 work in parallel repair pathway during DNA-protein crosslink repair.