

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Adéla Nedavašková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Identifikace nových genů zapojených v opravách
DNA-proteinových crosslinků u *Arabidopsis***

Bakalářská práce

Adéla Nedavašková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: Mgr. Eva Dvořák Tomašíková, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Adéla NEDAVAŠKOVÁ
Osobní číslo: R19847
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Identifikace nových genů zapojených v opravách DNA-proteinových crosslinků u *Arabidopsis*
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Zpracování literární rešerše na téma poškození DNA se zaměřením na toxické DNA-proteinové crosslinky.
2. Výběr kandidátních rostlin senzitivních na zebularin z M3 generace EMS-mutagenizované populace rostlin.
3. Vytvoření mapovacích populací pro validované kandidátní rostliny, izolace genomické DNA z mapovací populace.
4. Zvládnutí *in vitro* technik používaných při práci s *Arabidopsis* ve sterilním prostředí.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- Hacker, L., Dorn, A., Puchta, H., Enderle, J., Lambing, C., Tock, A.J., Choi, K., Topp, S.D., et al (2020) Repair of DNA-protein crosslinks in plants. *DNA Repair (Amst)* 87: 102787
- Kühbacher, U., Duxin, J.P. (2020) How to fix DNA-protein crosslinks. 94: 102924
- Liu, C.H., Finke, A., Diaz, M., Rozhon, W., Poppenberger, B., Baubec, T., Pecinka, A. (2015) Repair of DNA damage induced by the cytidine analog zebularine requires ATR and ATM in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27: 1788–1800
- Nowicka, A., Tokarz, B., Zwyrkova, J., Dvorak Tomastikova, E., Prochazkova, K., Ercan, U., Finke, A., Rozhon, W., Poppenberger, B., Otmar, M., et al (2020) Comparative analysis of epigenetic inhibitors reveals different degrees of interference with transcriptional gene silencing and induction of DNA damage. *Plant J* 102: 68–84
- Stinglee, J., Bellelli, R., Boulton, S.J. (2017) Mechanisms of DNA-protein crosslink repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18: 563–573

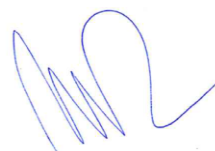
Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Eva Dvořák Tomašíková, Ph.D.
ÚEB – CR Haná

Oponent bakalářské práce: Mgr. Jitka Jemelková

Datum zadání bakalářské práce: 15. března 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

L.S.

27 -04- 2022



doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 16. března 2021

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení autora: Adéla Nedavašková

Název práce: Identifikace nových genů zapojených v opravách DNA-proteinových crosslinků u *Arabidopsis*

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Eva Dvořák Tomašíková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2022

Abstrakt:

DNA-proteinové crosslinky představují pro buňky vysoce toxické poškození v podobě kovalentního spojení proteinů s řetězcem DNA. Pokud nejsou včas opraveny, může docházet k mutacím a buněčné smrti. Naštěstí si buňky vytvořily efektivní cesty, kterými dokážou obnovit původní strukturu genetického materiálu a zachovat tak integritu genomu.

Pro identifikaci genů, které hrají roli v opravách DNA-proteinových crosslinků, byl ve vědecké skupině doc. Aleše Pečinky navržen dopředný genetický screen, který využívá EMS-mutagenizované populace rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). K indukci DNA-proteinových crosslinků sloužil zebularin – cytidinový analog, jehož schopností je zachytávat enzym METYLTRANSFERÁZU 1 na DNA a vytvářet tak sterické zábrany pro jiné enzymy spjaté s DNA. Rostliny, ve kterých vlivem mutace došlo k inaktivaci kauzálního genu, vykazovaly díky ošetření zebularinem výraznou redukci kořene.

Pomocí těchto postupů byly nově objeveny kandidátní linie 21B-5 a 21B-30, k analýzám charakterizujícím efekt mutace však v rámci experimentální části bakalářské práce sloužila pouze linie 21B-5.

Klíčová slova: *Arabidopsis thaliana*, DNA-proteinové crosslinky, zebularin

Počet stran: 41

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Adéla Nedavašková

Title: Identification of new genes involved in DNA-protein crosslink repair in *Arabidopsis*

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

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

The year of presentation: 2022

Abstract:

DNA-protein crosslinks represent highly toxic damage to cells in the form of a covalent linkage of proteins with a DNA strand. If not properly repaired, DNA-protein crosslinks can lead to mutation and cell death. Fortunately, cells have evolved effective DNA repair pathways to restore the original structure of genetic material and thus maintain their genomic integrity.

To identify genes that play a role in DNA-protein crosslink repair, the research group of Doc. Aleš Pečinka designed a forward-directed genetic screen that uses EMS-mutagenized populations of the thale cress (*Arabidopsis thaliana*). Zebularine – a cytidine analog was used to induce DNA-protein crosslinks, because of its ability to covalently trap METHYLTRANSFERASE 1 on the DNA and thus create steric hindrance to other DNA-related enzymes. Plants in which the causal gene was inactivated by the mutation showed significant root reduction after the zebularine treatment.

This allowed me to find candidate lines 21B-5 and 21B-30, but only line 21B-5 was used for analysis identifying and also characterizing the causal mutation as a factor involved in DNA-protein crosslink repair.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, DNA-protein crosslinks, zebularine

Number of pages: 41

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Identifikace nových genů zapojených v opravách DNA-proteinových crosslinků u *Arabidopsis* vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Evy Dvořák Tomašíkové, Ph.D. a za použití uvedené literatury.

V Olomouci dne 6. 5. 2022

.....

Nedavašková Adéla

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování Mgr. Evě Dvořák Tomašíkové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady, a především za velkou trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat celé vědecké skupině doc. Mgr. Aleše Pečinky, Ph.D. za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

OBSAH

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | ÚVOD | 1 |
| 2 | CÍLE PRÁCE | 2 |
| 3 | LITERÁRNÍ PŘEHLED | 3 |
| 3.1 | Husníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>) | 3 |
| 3.2 | Poškození DNA | 4 |
| 3.2.1 | Role EMS činidla | 4 |
| 3.2.2 | Typy poškození DNA | 4 |
| 3.3 | DNA-proteinové crosslinky | 6 |
| 3.3.1 | Typy DNA-proteinových crosslinků | 6 |
| 3.4 | Cytidinové analogy | 8 |
| 3.4.1 | Typy cytidinových analogů | 8 |
| 3.5 | Opravy DNA-proteinových crosslinků | 10 |
| 3.5.1 | Endonukleolytické štěpení DPC | 10 |
| 3.5.2 | Proteolytická degradace DPC | 11 |
| 3.5.3 | Enzymatická hydrolýza DPC | 11 |
| 4 | MATERIÁL A METODY | 14 |
| 4.1 | Biologický materiál | 14 |
| 4.2 | Použité chemikálie, soupravy a roztoky | 15 |
| 4.2.1 | Použité chemikálie | 15 |
| 4.2.2 | Použité soupravy | 15 |
| 4.2.3 | Použité roztoky a jejich příprava | 16 |
| 4.2.4 | Použité primery | 16 |
| 4.3 | Seznam použitých přístrojů a zařízení | 17 |
| 4.3.1 | Přístroje a zařízení | 17 |
| 4.3.2 | Programy | 17 |
| 4.4 | Použité experimentální a vyhodnocovací postupy | 18 |
| 4.4.1 | Sterilizace semen pro kontrolovaný výsev | 18 |
| 4.4.2 | Validace M ₃ kandidátních linií rostlin EMS-mutagenizované populace | 18 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.4.3 | Křížení kandidátních linií rostlin..... | 18 |
| 4.4.4 | Izolace gDNA..... | 19 |
| 4.4.5 | Izolace RNA..... | 19 |
| 4.4.6 | Měření koncentrace a čistoty izolovaných nukleových kyselin..... | 19 |
| 4.4.7 | Sekvenování nové generace (NGS)..... | 19 |
| 4.4.8 | Syntéza cDNA..... | 19 |
| 4.4.9 | Polymerázová řetězová reakce..... | 20 |
| 4.4.10 | Agarózová gelová elektroforéza..... | 21 |
| 4.4.11 | Purifikace PCR reakční směsi..... | 21 |
| 5 | VÝSLEDKY..... | 22 |
| 5.1 | Výběr pravých senzitivních linií 21B..... | 22 |
| 5.2 | Příprava mapovací populace u kandidátní linie 21B-5 a identifikace zasaženého genu | 24 |
| 5.3 | Ověření mutace v genu pomocí komplementačního křížení..... | 26 |
| 5.4 | Ověření pozice mutace pomocí Sangerova sekvenování..... | 26 |
| 5.5 | Charakterizace efektu mutace na výsledný transkript pomocí Sangerova sekvenování | 28 |
| 5.6 | Kandidátní linie 21B-30..... | 30 |
| 6 | DISKUSE..... | 32 |
| 7 | ZÁVĚR..... | 35 |
| 8 | LITERATURA..... | 36 |

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|----------------------------------|---|
| ADR1 | Z anglického „Activated disease resistance 1“ |
| AP místa | Abazická místa |
| ATM | Kináza signalizující poškození DNA (z anglického „Ataxia telangiectasia mutated“) |
| ATR | Kináza související s Rad3 signalizující poškození DNA (z anglického „Ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related“) |
| BCF ₁ /F ₂ | Zpětné křížení F ₁ /F ₂ generace (z anglického „back cross F ₁ /F ₂ “) |
| BER | Bázová excizní oprava (z anglického „base excision repair“) |
| BRCA1 | Z anglického „Breast cancer susceptible 1“ |
| cDNA | Komplementární DNA |
| CPT | Kamptotecin |
| dL | 2-deoxyribonolakton |
| DNMT | DNA-metyltransferáza |
| DPC | DNA-protein crosslink |
| DSB | Dvouvláknové zlomy (z anglického „double-strand break“) |
| EME1 | Endonukleáza z heterodimerního komplexu MUS81-EME1 (z anglického „Essential meiotic endonuclease 1“) |
| EMS | Etylmetansulfonát |
| ENT3 | Ekvilibrační nukleosidový transportér (z anglického „Equilibrative nucleoside transporter 3“) |
| gDNA | Genomová DNA |
| HJ | Hollidayův spoj (z anglického „Holliday junction“) |
| HR | Homologní rekombinace |
| ICRF-187 | Dexrazoxan |
| MET1 | Metyltransferáza 1 |
| MUS81 | Metylmetansulfonát, UV senzitivní protein 81 (z anglického „Methyl methanesulfonate and UV sensitive protein 81“) |
| NGS | Sekvenování nové generace (z anglického „next generation sequencing“) |
| PARP1 | Poly(ADP-ribóza) polymeráza 1 |

| | |
|--------|---|
| Polβ | DNA polymeráza beta |
| PS1 | Z anglického „Parallel spindle 1“ |
| RAD51 | Z anglického „Ras associated with diabetes 51“ |
| SMC5/6 | Komplex strukturní údržby chromozomů 5/6 (z anglického „Structural maintenance of chromosomes 5/6“) |
| SNI1 | Podjednotka SMC5/6 komplexu (z anglického „Suppressor of <i>npr1-1</i> , inducible 1“) |
| SNP | Jednonukleotidový polymorfismus (z anglického „single-nucleotide polymorphism“) |
| SPRTN | Metaloproteáza Spartan |
| SSB | Jednovláknové zlomy (z anglického „single-strand break“) |
| SUMO | Malý modifikátor podobný ubiquitinu (z anglického „Small ubiquitin-like modifier“) |
| T-DNA | Transferová DNA |
| TDP1/2 | Tyrosyl-DNA fosfodiesteráza 1/2 |
| TOP1/2 | Topoizomeráza 1/2 |
| UV | Ultrafialové záření |
| W35 | Běžný typ (z anglického „wild type“) |
| WSS1 | Metaloproteáza účastnící se opravy DNA-proteinových crosslinků (z anglického „Weak suppressor of Smt3“) |
| ZEB | Zebularin [1-(β-D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-on] |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Morfologie huseničky rolního (<i>Arabidopsis thaliana</i>) v různých fázích životního cyklu. . | 3 |
| Obrázek 2: Typy poškození DNA a příčiny jejich vzniku..... | 5 |
| Obrázek 3: Typy DNA-proteinových crosslinků..... | 7 |
| Obrázek 4: Srovnání chemické struktury cytidinu a jeho analogů. | 9 |
| Obrázek 5: Specifické modely oprav DNA-proteinových crosslinků. | 12 |
| Obrázek 6: Výběr senzitivních kandidátních linií na základě analýzy délky kořenů. | 22 |
| Obrázek 7: Fenotypy vybraných kandidátních linií senzitivních k zebularinu..... | 23 |
| Obrázek 8: Fenotyp kandidátní linie 21B-5 a BCF ₂ mapovací populace. | 24 |
| Obrázek 9: Graf frekvence výskytu jednonukleotidového polymorfismu (SNP) kandidáta 21B-5 na chromozomu 1..... | 25 |
| Obrázek 10: Fenotyp kandidátní linie 21B-5 a jedince vzniklého komplementačním křížením..... | 26 |
| Obrázek 11: Elektroforetická separace PCR produktů gDNA linií W35 a 21B-5 s očekávanou velikostí. | 27 |
| Obrázek 12: Schéma genu <i>DPCR7</i> kandidátní linie 21B-5 s očekávanou sestřihovou variantou mutace. | 27 |
| Obrázek 13: Schématické porovnání sekvencí gDNA kontrolní linie W35 s kandidátní linií 21B-5. | 27 |
| Obrázek 14: Elektroforetická separace PCR produktů cDNA linií W35 a 21B-5 s rozdílnou velikostí. | 28 |
| Obrázek 15: Schématické porovnání sekvencí cDNA kontrolní linie W35 s kandidátní linií 21B-5.. | 29 |
| Obrázek 16: Vznik předčasného terminačního kodonu v oblasti intronu 5 během syntézy proteinu <i>DPCR7</i> | 29 |
| Obrázek 17: Fenotyp kandidátní linie 21B-30 a BCF ₂ mapovací populace. | 30 |
| Obrázek 18: Graf frekvence výskytu jednonukleotidového polymorfismu (SNP) kandidáta 21B-30 na chromozomu 1..... | 31 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1: Seznam použitých linií rostlin huseníčku rolního (<i>Arabidopsis thaliana</i>). | 14 |
| Tabulka 2: Podmínky růstu rostlin huseníčku rolního (<i>Arabidopsis thaliana</i>) v různém prostředí..... | 14 |
| Tabulka 3: Seznam primerů určených pro PCR amplifikaci a Sangerovo sekvenování..... | 16 |
| Tabulka 4: Složení reakční směsi pro syntézu cDNA. | 20 |
| Tabulka 5: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci. | 20 |
| Tabulka 6: Program PCR reakce. | 20 |
| Tabulka 7: Složení purifikační směsi a program reakce pro purifikaci PCR reakční směsi..... | 21 |
| Tabulka 8: Požadavky firmy SEQME pro sekvenování s použitím vlastních primerů. | 21 |
| Tabulka 9: Kandidátní SNP v lokalizované oblasti chromozomu 1. | 25 |
| Tabulka 10: Dva kandidátní SNP v lokalizované oblasti chromozomu 1. | 31 |

1 ÚVOD

Uvnitř buněk živých organismů dochází každou minutu k obrovskému množství procesů, které jsou důležité pro zachování integrity genomu. Ta však bývá často narušena, protože organismy jsou konstantně vystavovány vlivům vnitřního a vnějšího prostředí, jež mohou způsobovat různě závažné typy poškození DNA. Mezi takové poškození patří například DNA-proteinové crosslinky. Ty vznikají pomocí chemikálií, jejichž typickou schopností je vytvářet kovalentní vazby mezi DNA a proteinem. Následkem této interakce dochází ke vzniku bariéry pro pohyb dalších enzymů spjatých se správným fungováním základních procesů, jako je replikace nebo transkripce.

Jednou z chemikálií, které způsobují tvorbu DNA-proteinových crosslinků, je i analog cytidinu – zebularin. Zebularin se během DNA syntézy začleňuje do nově vzniklého vlákna místo cytosinu a indukuje tvorbu kovalentních vazeb s METYLTRANSFERÁZOU 1, která po replikaci metyluje DNA. Tím zapříčiní zablokování aktivity tohoto enzymu a současně i celkové snížení metylace DNA. Aby byla zachována stabilita genomu a minimalizovalo se riziko vzniku dalších poškození, je nutné zajistit opravu těchto vysoce toxických lézí.

K nalezení nových genů podílejících se na opravách DNA-proteinových crosslinků je možné využít dopředný genetický screen. Jedná se o soubor postupů, které jsou aplikovány na populaci rostlin huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) mutagenizovanou EMS činidlem.

I když byla v minulosti objevena řada genů účastnících se oprav kovalentních vazeb mezi DNA a proteinem, mechanismus oprav stále není zcela objasněn. Odhalením nových genů u rostlin se však věda dostává blíže k pochopení tohoto komplikovaného procesu.

2 CÍLE PRÁCE

- Prostudování dostupných literárních zdrojů.
- Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
- Výběr kandidátních rostlin senzitivních na zebularin z M₃ generace EMS-mutagenizované populace rostlin.
- Vytvoření mapovacích populací kandidátních rostlin a izolace jejich genomické DNA.
- Celogenomové sekvenování mapovacích populací.
- Identifikace kauzálních genů, které se zapojují do oprav DNA-proteinových crosslinků u rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*).

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

Huseníček rolní patří v čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) mezi jednoleté nebo ozimé byliny. Typický je pro něj tenký hlavní kořen, přizemní listová růžice, přímá lodyha a bílé korunní lístky. V drobném květu se nachází jeden pestík obklopený většinou 6 tyčinkami (Obrázek 1). Rozmnožuje se především samosprášením, což umožňuje diferenciaci a ustálení drobných morfologicko-ekofyziologických odchylek.



Obrázek 1: Morfologie huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) v různých fázích životního cyklu.

(A) Vývoj od semene (vlevo dole) přes vegetativní fázi (11–39 dní), která je následně vystřídána fází generativní (45–59 dní). Poté následuje senescence. (B) Detail květu, (C) pylového zrna a (D) zralých šesulí (vlevo zavřená šesule, vpravo otevřená šesule se semeny) (převzato z Krämer, 2015).

Huseníček rolní je rozšířen po celém území České republiky a nalézt jej můžeme především na vysychavých půdách. Dříve se mělo za to, že se jedná o často vyskytující se a nevýznamný plevel polních kultur. Od 21. století je však využíván ve vědě jako důležitý objekt genetických studií, protože poskytuje několik výhod (Štěpánek, 1992). Jednou z nich je relativně krátká generační doba, dlouhá okolo 5 týdnů. Další výhodou je genom, který má velikost pouhých 125 Mbp a je tvořen pěti chromozomy. Na nich se nachází zhruba 27000 genů kódujících proteiny a mnohé z těchto genů můžeme nalézt i u jiných druhů rostlin (Meinke *et al.*, 1998; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Genetickou analýzou huseníčku rolního získáváme informace nejen o fungování některých genů, ale i informace pro pochopení základních genetických rozdílů mezi rostlinami a jinými eukaryotními organismy.

3.2 Poškození DNA

DNA, jakožto základní jednotka dědičnosti, je přirozeně reaktivní a zároveň vysoce citlivá molekula na chemické modifikace (Chatterjee *et Walker*, 2017). Buňky jsou neustále vystavovány činidlům z vnitřního i vnějšího prostředí (Obrázek 2), které mohou způsobovat mutace a narušovat tak integritu genomu (Stingele *et al.*, 2014).

Do skupiny činidel z vnitřního prostředí patří například reaktivní formy kyslíku nebo nezbytný metabolický meziprodukt, reaktivní formaldehyd. Ten vzniká v organismu z aminokyselin serinu, glycinu či methioninu nebo je produkován demetylací z metabolismu xenobiotických chemikálií.

Formaldehyd se však řadí i mezi činidla druhé skupiny, kdy jako velkoobjemová chemická látka může vstupovat do těla z vnějšího prostředí (Swenberg *et al.*, 2011). Není však jediný. Dále do skupiny činidel z vnějšího prostředí patří sloučeniny platiny a analogy cytidinu (Chválová *et al.*, 2007; Baubec *et al.*, 2009). Z fyzikálních činitelů je to pak ionizující záření nebo elektromagnetické záření v podobě UV světla (Ho *et al.*, 1994; Cadet *et al.*, 2005).

3.2.1 Role EMS činidla

Etylmetansulfonát (EMS) je alkylační činidlo, které díky svým účinkům patří k nejčastěji používaným chemickým mutagenům u rostlin. Mezi další chemické mutageny se řadí azid sodný, diepoxybutan a nitrosloučeniny. EMS alkyluje guaninové báze, což má za následek chybné párování alkylovaného guaninu s thyminem. Dochází tak primárně k tranzicím G/C na A/T. Jelikož způsobuje vysokou frekvenci jednonukleotidových změn v genomu, je tak ideální chemikálií k vytváření různých typů mutací (Talebi *et al.*, 2012).

Bodové mutace produkované EMS lze detekovat pomocí sekvenování nové generace (NGS). Populaci mutagenizovanou EMS lze analyzovat pomocí dopředné genetiky.

Jelikož jsou u dopředné genetiky zjevné fenotypy charakterizovány ještě před identifikací základního genu, dostává se jí využití při studiu EMS-mutantních rostlin se specifickým a pro nás zajímavým vzhledem – v našem případě senzitivita rostlin k zebularinu. Tento fakt představuje významnou výhodu v porovnání s metodami reverzní genetiky, u níž jsou naopak nejprve detekovány mutace v požadovaných genech a ty jsou až později spojeny se specifickou funkcí nebo fenotypem (Espina *et al.*, 2018).

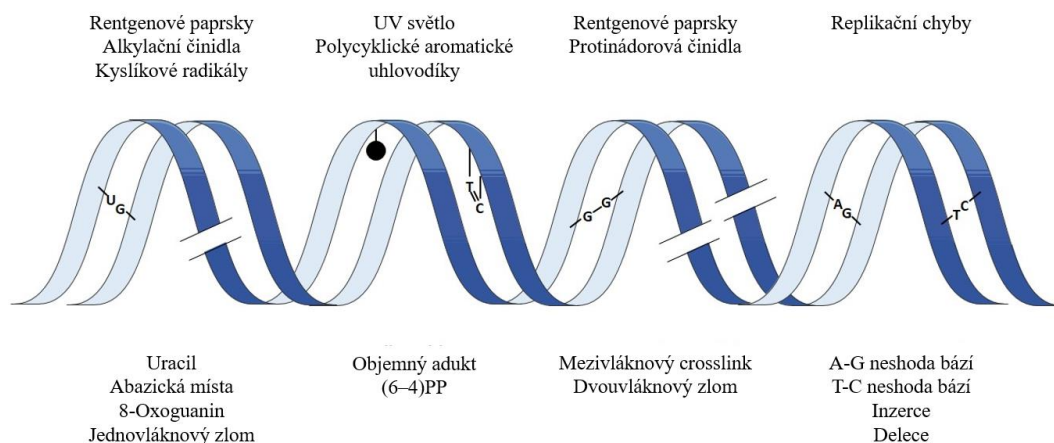
3.2.2 Typy poškození DNA

Mezi jednotlivými typy poškození DNA jsou výrazné rozdíly, jelikož mohou sahát od jednonukleotidových změn v řetězcích DNA až po zlomy chromozomů (Obrázek 2). K rozsáhle studovaným a dobře pochopeným poškozením patří například poškozené báze nebo zlomy řetězce DNA (Kuzminov, 2001; Caldecott, 2008; Chan *et al.*, 2013).

Poškozené dusíkaté báze mají za následek především chybné kódování aminokyselin. Pokud však nedojde k opravě těchto lézí ještě před replikací DNA, mohou vést k fixaci mutací v genomu. Základním nástrojem pro opravu těchto lézí je excize bází (BER), kterou zahajuje enzym N-glykosyláza. Její schopností je rozpoznat poškozenou bázi a následně ji vystříhnout z vlákna dvoušroubovice, někdy ale dochází k chybnému vystříhnutí normální báze. Oba zmiňované případy vedou ke vzniku abazických míst (Chan *et al.*, 2013).

Abazická místa (AP místa) jsou oblasti na DNA, kde chybí purinová nebo pyrimidinová báze. Patří mezi jedny z nejčastějších lézí na DNA, podle odhadů se totiž v každé generaci savčích buněk vytvoří 2000–10000 AP míst (Lindahl *et Nyberg*, 1972; Nakamura *et Swenberg*, 1999). Jak již bylo zmíněno, vytvářejí se při opravě poškozených bází hydrolytickým štěpením N-glykosylové vazby nebo zahájením spontánní chemické depurinace oxidovaných bází (Nakamura *et Swenberg*, 1999). Tvorba AP míst je navíc pozitivně ovlivňována vysokými teplotami a extrémními podmínkami pH (Lindahl *et Nyberg*, 1972).

Velmi častý typ poškození DNA představují zlomy řetězce DNA, které se dělí na jednovláknové (SSB) a dvouvláknové (DSB). Jednovláknové zlomy jsou diskontinuity v jednom vlákně dvoušroubovice DNA, které spojuje poškození nebo nesprávné spárování 3' - a 5' -konců v místech SSB (Caldecott, 2008). Jedním z nejběžnějších zdrojů SSB je oxidační stres, zlomy v řetězci však mohou vznikat i díky chybné aktivitě buněčných enzymů nebo přímo při opravách poškození DNA (Dianov *et Parsons*, 2007). Již dříve bylo dokázáno, že se jednovláknové zlomy podílejí na vzniku rakoviny, neurodegenerativních onemocnění a srdečního selhání (Hossain *et al.*, 2018). Pokud nedojde k opravě SSB, mohou být během replikace DNA převedeny na škodlivější dvouvláknové zlomy (Kuzminov, 2001). Vzniklé DSB mají za následek zlomy a translokace chromozomů, což vede k vážné nestabilitě genomu (Ensminger *et al.*, 2014).



Obrázek 2: Typy poškození DNA a příčiny jejich vzniku.

V horní části jsou popsána běžná činidla způsobující poškození DNA. V dolní části jsou uvedeny typy poškození indukované těmito činidly (převzato a upraveno z Hoeijmakers, 2001).

3.3 DNA-proteinové crosslinky

Specifickým typem poškození na deoxyribonukleové kyselině jsou DNA-proteinové crosslinky (DPC), které vznikají v buňkách vystavených různým crosslinkačním činidlům a jsou definovány tvorbou kovalentní vazby mezi proteinem a DNA (Nakano *et al.*, 2013; Enderle *et al.*, 2019). Kvůli nadměrné velikosti proteinové části dochází na chromatinu ke vzniku sterické zábrany, která způsobuje narušení mnoha základních procesů probíhajících na DNA, jako je transkripce a replikace (Enderle *et al.*, 2019). DPC jsou kvůli různým velikostem a strukturám připojených proteinů, typům vazeb a rozdílnému působení crosslinkačních činidel, pravděpodobně jedním z nejvariabilnějších typů poškození DNA (Prochazkova *et al.*, 2022).

3.3.1 Typy DNA-proteinových crosslinků

V současné době lze DNA-proteinové crosslinky rozdělit na 4 typy v závislosti na asociaci se zlomy DNA sousedící s DPC (Obrázek 3), ale také na zdroji a mechanismu vzniku DPC (Reardon *et al.*, 2006; Ide *et al.*, 2011).

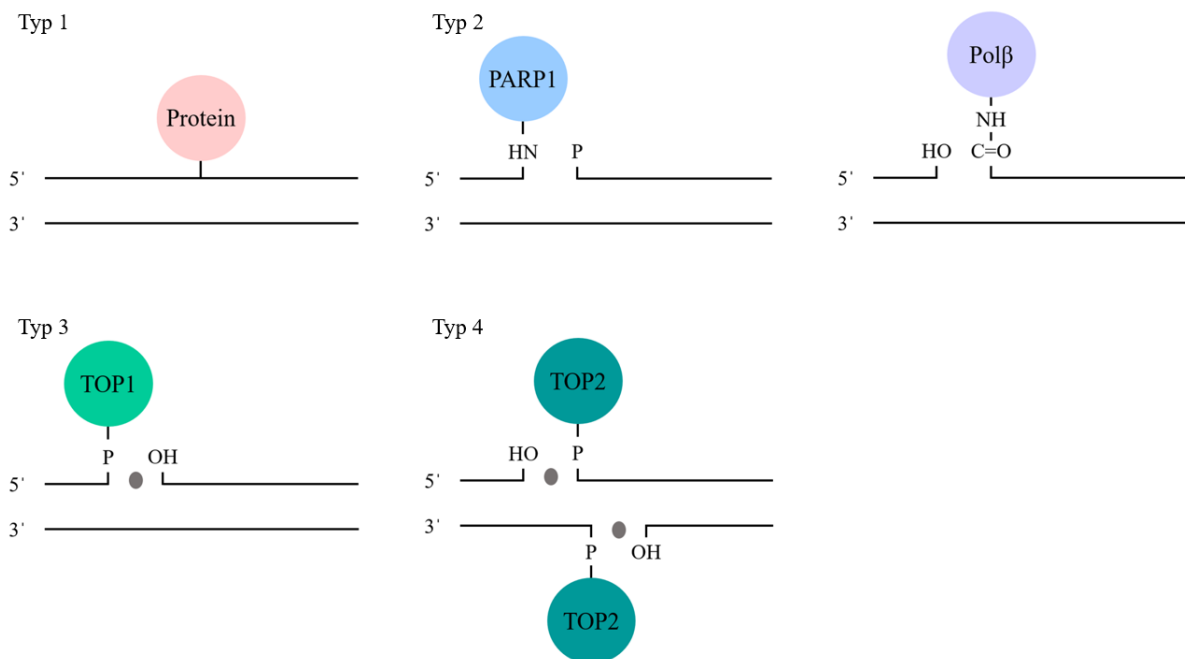
1. typ DNA-proteinových crosslinků není spojen se zlomy na DNA, místo toho dochází ke spojení proteinu s neporušeným řetězcem DNA. Tento typ se vyskytuje velmi často, protože jakýkoli druh proteinu nacházející se poblíž DNA může pod vlivem různých činidel vytvořit tzv. neenzymatické DPC (Ide *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2020). Tím se tento typ odlišuje od zbylých, tzv. enzymatických DPC, které jsou naopak indukované specifickými jedy stabilizujícími jinak přechodnou vazbu enzymu na DNA (Zhang *et al.*, 2020).

K indukci 1. typu slouží například formaldehyd, který produkuje DPC tvorbou metylenových můstků mezi jednotlivými nukleosidy a zbytky nukleofilních aminokyselin (Lu *et al.*, 2010). Vliv ionizujícího záření vede k radiolýze molekul vody, což má za následek vysoké hladiny volných radikálů DNA, které následně reagují s proteinem spojeným s DNA za vzniku DPC (Nakano *et al.*, 2017). Cytidinové analogy jsou zase schopny zachytit DNA metyltransferázu (DNMT) na DNA (Prochazkova *et al.*, 2022). Cytidinové analogy však budou podrobněji popsány v podkapitole 3.4.

2. typ DNA-proteinových crosslinků vzniká při opravě DNA bází excízi buďto pomocí POLY(ADP-RIBÓZA) POLYMERÁZY 1 (PARP1), nebo DNA polymerázy Pol β (Prasad *et al.*, 2014; Quiñones *et al.*, 2015). PARP1 je hojně exprimovaný jaderný enzym asociovaný s chromatinem, který se podílí na rozpoznání poškození DNA zahrnující vazbu na zlomy v DNA, ta ale může být trvalá (Horton *et al.*, 2014). Tvorba PARP1 DNA-proteinových crosslinků je podporována působením olaparibu, veliparibu a dalších malomolekulárních inhibitorů, protože potlačují katalytickou aktivitu PARP1 a tím ji zachycují na DNA (Murai *et al.*, 2012). Pol β DNA-proteinové crosslinky se tvoří za přítomnosti volných radikálů nebo oxidačních činidel. Jejich působením se na DNA nejprve vytvoří oxidované abazické místo (AP místo) 2-deoxyribonolakton (dL), které zapříčiní vznik kovalentní vazby s DNA polymerázou β během pokusu o opravu DNA (Quiñones *et al.*, 2015). O významu tohoto typu DPC u rostlin je však pouze omezené množství informací (Ide *et al.*, 2018).

3. a 4. typ DNA-proteinových crosslinků pochází z trvalého zachycení normálně přechodného kovalentního meziprojektu topoizomeráza-DNA během reakčního cyklu enzymu (Stingele *et al.*, 2015). Topoizomerázy patří do velké rodiny enzymů, jejichž schopností je štěpit hlavní řetězec DNA, rozplétat různé komplexní struktury a následně spojit štěpenou DNA. Klasifikovány jsou jako topoizomeráza 1 (TOP1) nebo topoizomeráza 2 (TOP2) v závislosti na tom, jaký typ vláknového zlomu produkují (Baker *et al.*, 2009). K zachycení meziprojektů enzymatických reakcí může docházet spontánně, nebo pomocí enzymových jedů. Tyto jedy stabilizují topoizomerázy na DNA tvorbou kovalentní vazby, čímž navíc zabraňují religaci narušené DNA (Pommier *et Marchand*, 2011; Enderle *et al.*, 2019). Deformace v DNA taktéž podporují tvorbu DPC 3. a 4. typu (Stingele *et al.*, 2014).

Ačkoli je původ obou typů DPC velmi podobný, důsledky pro integritu genomu se kvůli jejich rozdílnému chemickému složení značně liší. U DPC 3. typu je topoizomeráza 1 spojena s DNA prostřednictvím tyrosyl-fosfodiesterové vazby na 3'-konci jednovláknového zlomu například působením enzymového jedu kamptotecinu (CPT). Naproti tomu u DPC 4. typu je zachycená topoizomeráza 2 spojena s DNA prostřednictvím dvou tyrosyl-fosfodiesterových vazeb na 5'-konicích dvouvláknového zlomu například díky účinku dexrazoxanu (ICRF-187) (Wang, 1996).



Obrázek 3: Typy DNA-proteinových crosslinků.

Typ 1 – protein kovalentně připojený k neporušenému řetězci, **Typ 2** – PARP1 připojená k 3' konci SSB a polymeráza Polβ spojená s 5' koncem SSB, **Typ 3** – TOP1 připojená k 3' konci SSB pomocí tyrosyl-fosfodiesterové vazby, **Typ 4** – TOP2 připojená ke dvěma 5' koncům DSB pomocí tyrosyl-fosfodiesterových vazeb (převzato a upraveno ze Zhang *et al.*, 2020).

3.4 Cytidinové analogy

Chemické analogy cytosinu jsou široce používanými inhibitory enzymů, které jsou ústřední pro metabolismus nukleových kyselin. Schopností těchto inhibitorů je inkorporovat se do dvoušroubovice DNA a následně ovlivňovat její metylaci (Santi *et al.*, 1983; Zhou *et al.*, 2002).

Metylace DNA, kterou zajišťují enzymy z rodiny DNA metyltransferáz (DNMT), je fenoménem epigenetické regulace napříč širokou škálou organismů (Finnegan *et al.*, 1996). Při tomto procesu totiž dochází k umlčování genů řídících základní buněčné procesy (Gnyszka *et al.*, 2013). V běžném případě probíhá tak, že je metylová skupina přenesena z kofaktoru S-adenosylmethioninu na 5. pozici pyrimidinového kruhu cytosinu. Vznik 5-metylcytosinu následně vede k uvolnění DNMT pomocí β -eliminace, začleněné cytidinové analogy však procesu uvolnění zabraňují. Výsledkem je tedy tvorba kovalentní vazby s DNMT, která způsobí zablokování enzymu na DNA (Gowher *et al.*, 2004; Baubec *et al.*, 2009).

Nejnámějším a zároveň běžně využívaným inhibitorům je věnována následující část.

3.4.1 Typy cytidinových analogů

Azacytidin (5-azacytidin) a decitabin (5-aza-2'-deoxycytidin) patří k dosud nejúspěšnějším a stále nejrozšířenějším epigenetickým modulátorům (Gnyszka *et al.*, 2013).

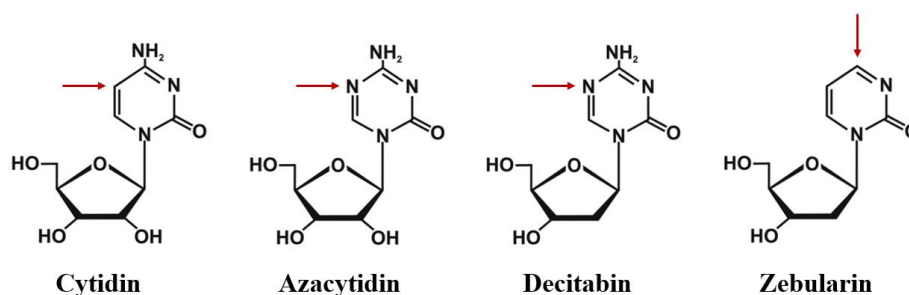
Jedná se o nemetylovatelné analogy cytidinu ze skupiny 5-azacytidinů, jejichž chemická struktura obsahuje dusík místo uhlíku v poloze 5 pyrimidinového kruhu. Liší se ale svou cukernou částí, kdy azacytidin je tvořen ribózou a decitabin deoxyribózou, díky tomu u nich dochází k odlišnému metabolismu (Obrázek 4) (Dowd *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2021). Zatímco ribonukleosid azacytidin je začleněn do RNA a v menší míře i do DNA, analog deoxyribózy decitabin může být inkorporován pouze do vlákna DNA (Yang *et al.*, 2010).

Obě sloučeniny jsou charakterizovány jako jediné epiléky, které byly schváleny pro léčbu pacientů s akutní myeloidní leukémií a myelodysplastickým syndromem (Gnyszka *et al.*, 2013). Zásadou jejich inhibičních vlastností totiž fungují jako molekulární nástroje pro indukci demetylace DNA v buněčných modelových systémech (Stresemann *et al.*, 2008).

Transport nukleosidů a nukleosidových metabolitů přes buněčnou membránu zprostředkovávají specializované transportéry (Chen *et al.*, 2006). Po buněčném příjmu jsou azanukleosidy modifikovány na jejich trifosfátové formy a integrovány do genomu rychle proliferujících buněk. Inkorporované cytidinové analogy poté narušují interakci mezi DNA a DNMT prostřednictvím dusíku v poloze 5 modifikovaného pyrimidinu (Yang *et al.*, 2010).

Navzdory jejich častému používání a vysoké účinnosti při léčbě rakoviny jsou azacytidin i decitabin považovány za nestabilní a vysoce toxické (Stresemann *et al.*, 2008). Kvůli zlepšení vlastností cytidinových analogů byl vyvinut nový inhibitor – zebularin [1-(β -D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-on]. Ten poskytuje výhody, jako je vyšší stabilita, delší poločas rozpadu či menší množství vedlejších účinků (Cheng *et al.*, 2003; Ben-Kasus *et al.*, 2005).

Chemickou strukturu zebularinu tvoří 2-(1H)-pyrimidinový kruh, který postrádá aminoskupinu v poloze 4 a stejně jako u decitabinu je i jeho součástí cukr deoxyribóza (Obrázek 4) (Cheng *et al.*, 2003).



Obrázek 4: Srovnání chemické struktury cytidinu a jeho analogů.

Hlavním rozdílem je přítomnost dusíku na 5. pozici pyrimidinového kruhu u azacytidinu a decitabinu. Zebularinu zase chybí aminoskupina na pozici 4. Liší se také cukernou částí, kdy cytidin a azacytidin jsou tvořeny ribózou a decitabin se zebularinem deoxyribózou (převzato a upraveno z Gnyszka *et al.*, 2013).

Původně byl hodnocen jako inhibitor cytidindeaminázy, na základě svých vlastností však začal být používán různými studiemi jako potenciální protinádorová látka (Gnyszka *et al.*, 2013). Zajímavý je taktéž charakter zebularinu v rostlinném výzkumu, kdy nejenže mění množství DNA metylace, ale také slouží jako induktor poškození DNA u huseničky rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Liu *et al.*, 2015).

Do buněk je zebularin aktivně transportován pomocí nukleosidového transportéru EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTER 3 (ENT3), který přepravuje také další, často toxické cytidinové analogy. Tento mechanismus je konzervován napříč živočišnou a rostlinnou říší (Li *et al.*, 2003; Prochazkova *et al.*, 2022). Uvnitř buněk je pak zebularin komplexně metabolicky aktivován. Aby byl začleněn do DNA, musí nejprve podstoupit fosforylaci následovanou konverzí na odpovídající deoxynukleotid (Ben-Kasus *et al.*, 2005). Po konverzi na 2'-deoxyzebularintrifosfát a následném začlenění dochází k tvorbě DNA-proteinových crosslinků 1. typu (Ben-Kasus *et al.*, 2005; Prochazkova *et al.*, 2022). Nepřítomnost 4-aminoskupiny zebularinu totiž neumožňuje aktivaci polohy cytosinu C5 a přenos metylové skupiny, což zabraňuje disociaci enzymu DNMT z DNA.

Předchozí principy transportu a aktivace zebularinu již byly prokázány pomocí biochemických analýz u bakterií (Champion *et al.*, 2010). Na základě genetických a molekulárně-biologických dat se předpokládá, že stejný mechanismus funguje i u rostlin. Potvrzená je například zebularinem indukovaná tvorba DPC pomocí proteinu METYLTRANSFERÁZY 1 (MET1) (Prochazkova *et al.*, 2022). Dále se ví, že poškození DNA způsobené zebularinem nastává specificky během replikace DNA a s největší pravděpodobností se objeví až během syntézy nového vlákna. Signalizace tohoto poškození

je zprostředkována aditivní aktivitou ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED (ATM) a ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD3-RELATED (ATR) kináz.

Účinky odlišující zebularin od jiných činidel poškozujících DNA podporují přítomnost specifické strategie opravy. Zejména bylo zjištěno, že STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 5/6 (SMC5/6) hraje důležitou roli v rámci homologní rekombinace (HR) při opravách poškození DNA vyvolaného zebularinem. Dosud však nedošlo k úplnému objasnění povahy poškození DNA vyvolaného inhibitorem a jeho opravného mechanismu (Liu *et al.*, 2015).

3.5 Opravy DNA-proteinových crosslinků

Pro zajištění stability genomu je nezbytná obnova nativní sekvence a struktury DNA pomocí opravných mechanismů specifických pro každý typ poškození. Zatímco opravy jednovláknových nebo dvouvláknových zlomů, příčných vazeb a aduktů bází byly středem zájmu studia u různých druhů organismů, opravám DNA-proteinových crosslinků se dlouhou dobu nevěnovala pozornost (Enderle *et al.*, 2019). Nicméně toxické DPC představují bariéru pro pohyb enzymů spojených s DNA, a proto jsou rozpoznány jako abnormální struktury spouštějící signalizaci pro odstranění těchto lézí na DNA (Stinglele *et al.*, 2016). U rostlin byly dosud identifikovány tři hlavní opravné dráhy DNA-proteinových crosslinků – endonukleolytické štěpení DNA v blízkosti DPC, proteolytické štěpení proteinové složky DPC a degradace fosfodiesterové vazby.

3.5.1 Endonukleolytické štěpení DPC

Endonukleolytické štěpení, které specificky cílí na odstranění crosslinkované DNA z DPC, je usnadněno především strukturně-specifickou resolvázou METHYL METHANESULFONATE AND UV SENSITIVE PROTEIN 81 (MUS81) (Enderle *et al.*, 2019).

MUS81 patří do rodiny endonukleáz a je vysoce konzervovaný napříč eukaryotickou říší, jeho biologická role se však mezi různými organismy liší. Spolu s endonukleázou ESSENTIAL MEIOTIC ENDONUCLEASE 1 (EME1) tvoří heterodimerní funkční komplex podílející se na procesech HR, který je navíc schopen rozlišit všestranné meziprodukty DNA, jako jsou Hollidayovy spoje (HJ) nebo zastavené replikační vidlice (Hartung *et al.*, 2006; Mannuss *et al.*, 2010). Jelikož bylo zjištěno, že v souvislosti s CPT-senzitivitou se MUS81 u kvasinek podílí na opravách DPC, stal se protein zajímavým kandidátem ve výzkumu opravy DPC i u rostlin huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Liu *et al.*, 2002; Enderle *et al.*, 2019). Na rozdíl od kvasinek se v tomto modelovém organismu vedle homologu MUS81 vyskytují další dva homology EME1 proteinů, z nichž oba sestavují komplex řešící poškozené struktury specifickým mechanismem (Geuting *et al.*, 2009; Enderle *et al.*, 2019). Jedná se o proces, během kterého komplex MUS81-EME1 s největší pravděpodobností provádí symetrické řezy na vláknech DNA, čímž vzniká DSB umožňující přístup kanonickým opravným drahám (Geuting *et al.*, 2009).

3.5.2 Proteolytická degradace DPC

Existence proteázy, která specificky degraduje proteiny vázané na DNA, byla objevena teprve nedávno, ale už nyní se jedná o převládající mechanismus opravy DPC (Stingele *et al.*, 2014).

WEAK SUPPRESSOR OF SMT3 (WSS1) je metaloproteáza objevená u kvasinek, která původně souvisela s dráhou malého modifikátoru podobnému ubikvitinu (Stingele *et al.*, 2015; Enderle *et al.*, 2019). WSS1 byla prvním příkladem enzymu, která poskytovala odolnost vůči činidlům indukujícím DPC. Současný model opravy DPC je v případě kvasinek takový, že WSS1 proteázy interagují s chromatinem a specificky degradují většinu proteinových složek DPC, čímž umožňují postup replikační helikázy. Zbývající část peptidu kovalentně spojeného s DNA sice stále tvoří mechanickou zábranu, replikace DNA ale může pokračovat díky specifické polymeráze pro syntézu translézí. Tato alternativní cesta opravy, označovaná jako tolerance DPC, poté generuje DSB, které jsou dále zpracovány jinými mechanismy oprav (Stingele *et al.*, 2014). U zvířat je tato funkce zastoupena metaloproteázou Spartan (SPRTN), která byla na základě sekvenční podobnosti identifikována jako vzdálená příbuzná WSS1, jelikož vykazuje podobnou doménovou organizaci a sdílí společný evoluční původ i funkce (Stingele *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020).

I přes jejich pozoruhodnou proteolytickou aktivitu musí být DPC-proteázy z rodiny WSS1/SPRTN řízeny několika mechanismy, aby se vyhnulo degradaci jiných jaderných proteinů a bylo zajištěno zpracování pouze proteinů kovalentně spojených s DNA. Kdyby nedošlo ke kontrole tohoto procesu, mohlo by to mít škodlivé důsledky pro buňku. Jedním ze základních mechanismů kontroly objeveném u SPRTN se zdá být ubikvitinový přepínač. Ten spouští díky indukci DPC deubikvitinaci SPRTN, a tím umožňuje relokizaci chromatinu následovanou umístěním proteáz do místa opravy. Na druhé úrovni kontroly WSS1/SPRTN proteáza vyžaduje, aby se pro ni stala DNA proteolyticky aktivní (Stingele *et al.*, 2016).

Vzhledem k údajům získaným ze studií na kvasinkách a živočiších přivedla vědce na myšlenku, zda se mechanismus proteolytické degradace DPC vyskytuje i v rostlinné říši. Experimenty prováděné na huseníčku potvrdily, že se v jeho genomu nachází 2 ortology opravné metaloproteázy – WSS1A a WSS1B. Jako nezbytný nástroj pro opravu DPC však byla identifikována pouze WSS1A. Linie se ztrátou příslušného proteinu vykazovaly přecitlivělost na crosslinkační činidla CPT a cis-platinu, což naznačilo účast WSS1A jako klíčové proteázy při opravě enzymatických DNA-TOP1 crosslinků a také neenzymatických DPC indukovaných cis-platinou. V porovnání s kvasinkami však tato opravná dráha u rostlin nijak nesouvisí s HR, a proto se předpokládá oprava jinými mechanismy (Enderle *et al.*, 2019).

3.5.3 Enzymatická hydrolýza DPC

Kromě DNA nebo proteinové části DPC se můžou opravné mechanismy zaměřit i na samotnou crosslinkační vazbu, a právě k tomu slouží specializované enzymy TYROSYL-DNA FOSFODIESTERÁZA 1 (TDP1) a TYROSYL-DNA FOSFODIESTERÁZA 2 (TDP2) (Prasad *et al.*,

2019). TDP1 a TDP2 jsou významné pro opravu zachycených komplexů DNA-protein a pro zpracování různých 3' - a 5' -blokujících skupin na koncích DNA (Pommier *et al.*, 2014).

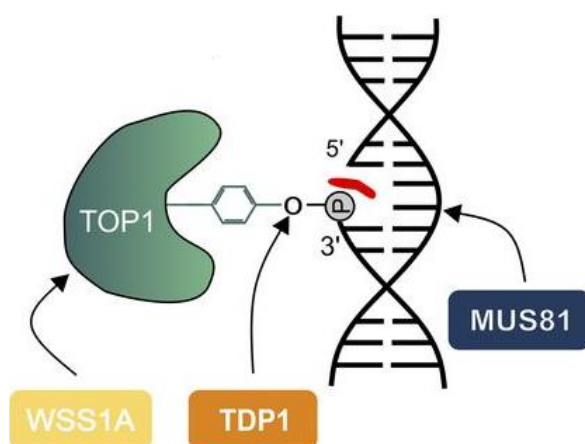
TDP1 se podílí na opravách DPC typu 2 a 3. Jeho schopností je katalyzovat hydrolýzu crosslinkační vazby mezi 3'-DNA koncem a PARP1/TOP1, předtím ale musí dojít k proteolýze navázaného proteinu (Ide *et al.*, 2018; Prasad *et al.*, 2019). Na 3'-konci zanechává fosfát, jehož odstranění následně katalyzuje polynukleotid kináza-fosfatáza (Ide *et al.*, 2018). Díky tomu se vytvoří 3'-hydroxylové konce, které mohou být prodlouženy polymerázami (Pommier *et al.*, 2014).

Opravné dráhy pomocí TDP1 se zdají být podobné jak pro DPC 2. typu, tak i pro DPC 3. typu. Důležitý rozdíl je především v tom, že TDP1 hydrolyzuje v případě PARP1 vazbu mezi 3'-koncem DNA a lysinovým primárním aminem proteinu, zatímco u TOP1 je hydrolyzována fosfodiesterová vazba mezi 3'-koncem DNA a aktivním tyrosylovým zbytkem proteinu (Prasad *et al.*, 2019).

TDP 2 je víceúčelový enzym, který se na rozdíl od TDP1 nevyskytuje u kvasinek, ale u obratlovců (Pommier *et al.*, 2014). Je zapojen do procesů signalizace, transkripční regulace a apoptotické regulace. Hlavní je ale jeho opravná funkce, kdy iniciuje opravu DPC 4. typu hydrolytickým odstraněním zachyceného topoizomerázového peptidu z 5'-konců DSB, čímž umožňuje religaci (Zeng *et al.*, 2011).

Aby byla zahájena aktivita TDP2, může dojít vedle známé proteolytické degradace proteinu i k denaturaci navázané TOP2 na DNA. Bylo totiž prokázáno, že SUMO E3 Ligáza podporuje sumoylaci TOP2 a aktivitu enzymu. Sumoylace indukuje konformační změnu proteinu a umožňuje tak přístup TDP2 ke crosslinku. Po úspěšné hydrolýze zesílení lze výsledný dvouvláknový zlom, pozůstatek po DPC typu 4, opravit přímo nehomologním spojováním konců (Schellenberg *et al.*, 2017; Zagnoli-Vieira *et al.* Caldecott, 2017).

Předchozí výzkumy prokázaly, že jsou všechny 3 specifické dráhy opravy DPC zachovány mezi různými organismy (Obrázek 5).



Obrázek 5: Specifické modely oprav DNA-proteinových crosslinků.

Tento typ DPC může být odstraněn endonukleolytickým štěpením DNA pomocí MUS81, proteolytickým působením WSS1A na proteinové části nebo hydrolýzou fosfodiesterové vazby přes TDP1 (převzato a upraveno z Enderle *et al.*, 2019).

Pomocí analýzy TDP1 a TDP2 byla potvrzena role enzymatické hydrolyzy DPC i u rostlin. Cesta řešení toxických crosslinků pomocí TDP1 je, na rozdíl od endonukleolytického štěpení DNA nebo proteolytické degradace proteinové části, vedlejší a využívá se především v nepřítomnosti enzymů jedné ze zmiňovaných opravných drah DPC. Enzym TDP2 je na druhou stranu přímo vyžadován pro opravu DNA-TOP2 crosslinků (Enderle *et al.*, 2019; Hacker *et al.*, 2022).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

V rámci mé bakalářské práce bylo otestováno 58 M₃ populací semen z rostlinné linie 21B huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Linie W35 a *smc6b-1* byly použity jako kontroly. Seznam použitých linií a jejich základní charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam použitých linií rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*).

| Název linie | Popis linie | Význam | Zdroj |
|----------------|---|--|----------------|
| W35 | Col-0 wild type | Rezistentní kontrola | Pecinka group |
| <i>smc6b-1</i> | Col-0, T-DNA inserce, chromozom 5, AT5G61460 | Senzitivní kontrola | SALK_101968C |
| 21B | Col-0 mutagenizovaná M ₃ populace pomocí EMS činidla | Výběr kandidátních linií rostlin | Pecinka group |
| <i>dpcr7</i> | Col-0, T-DNA inserce, chromozom 1 | Ověření EMS mutace pomocí komplementačního křížení | <i>dpcr7-2</i> |

Rostliny byly v různých fázích svého vývoje umísťovány do rozdílného prostředí. Po výsevu vysterilizovaných semen byly Petriho misky se vzorky inkubovány po dobu 7 dní v růstové komoře Percival. Poté byly vyklíčené rostliny přeneseny do substrátu ošetřeného přípravkem Careo a smíchaného s perlitem v poměru 3:1. Takto připravené rostliny byly pěstovány ve fytotronové komoře, dokud nedošlo k získání zralých nakřížených šesulí. Na závěr byly dospělé rostliny umístěny do skleníku. Jednotlivé podmínky růstu rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) jsou shrnuty v Tabulce 2.

Tabulka 2: Podmínky růstu rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) v různém prostředí.

| Prostředí | Podmínky | | Význam |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|---|
| | Den | Noc | |
| Růstová komora Percival | 16 h při 21 °C | 8 h při 18 °C | Klíčení semen <i>in vitro</i> , výběr kandidátních rostlin po 7 dnech, analýza délky kořenů |
| Fytotronová komora | 16 h při 19 °C (65% vlhkost) | 8 h při 18 °C (65% vlhkost) | Růst rostlin v substrátu, zrání a sběr nakřížených šesulí |
| Skleník | 16 h při 24 °C | 8 h při 16 °C | Skládování a sušení rostlin |

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- 1× TAE pufr
- Agar bacteriological (VWR Chemicals, kat. č. 84609.0500)
- Agarose ITM (VWR Chemicals, kat. č. 0710-500G)
- Destilovaná voda
- DMSO (dimetylsulfoxid) (Sigma-Aldrich, kat. č. 27043-1)
- DreamTaqTM Green DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EP0714)
- Etanol 96% (Lach-Ner, kat. č. 20025-A96)
- Etidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751-5G)
- Exonuclease I (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EN0582)
- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EF0651)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM1331)
- Chlornan sodný (Merck, kat. č. 1056142500)
- RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EO0381)
- Tween® 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P9416-100)
- Zebularin [1-(β-D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-on] (Sigma-Aldrich, kat. č. Z4775-25MG)
- β-merkaptioetanol (Sigma-Aldrich, kat. č. M3148)

4.2.2 Použité soupravy

- GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K0792)
- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K1632)
- RNase-Free DNase Set (50) (Qiagen, kat. č. 79254)
- RNeasy® Plant Mini Kit (50) (Qiagen, kat. č. 74904)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

10% hypochlorid sodný s 0,01% Tween® 20: Smíchat 7 ml zásobního roztoku NaClO s 3 ml destilované vody. Pomocí automatické pipety s odstříženou špičkou přidat 10 µl detergentu Tween® 20.

½ Murashige a Skoog (MS) médium (pH 5,8) s 0,6 nebo 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, upravit pH na 5,8 pomocí KOH a připravený roztok autoklávovat.

½ Murashige a Skoog (MS) médium s 0,6 nebo 0,8% agarem a s přidavkem 20 µmol·l⁻¹ zebularinu: Smíchat 100 µl 10 mmol·l⁻¹ zásobního roztoku zebularinu s 50 ml mírně vychladlého ½ MS média s 0,6 nebo 0,8% agarem.

1% agar pro fotodokumentaci natažených kořenů: Smíchat 2 g agaru s 200 ml destilované vody. Roztok v láhvi s neutaženým víčkem rozvařit v mikrovlnné troubě, dokud nebude zcela čirý. Rozlévat po 10 ml do Petriho misek a roztok nechat ztuhnout.

1× TAE pufr: Do nádoby nalít 20 ml 50× TAE pufru a doplnit destilovanou vodou na objem 1000 ml.

1% agarózový gel pro elektroforetickou separaci: Smíchat 1 g agarózy se 100 ml 1× TAE pufru. Roztok v láhvi s neutaženým víčkem rozvařit v mikrovlnné troubě, dokud nebude zcela čirý. Po vytažení z mikrovlnné trouby nechat chvíli zchladnout, následně k roztoku přidat 2 µl etidium bromidu a promíchat. Roztok nalít do elektroforetické komůrky s vloženým hřebínkem a nechat ztuhnout.

1× reakční pufr pro purifikaci PCR produktů: Smíchat 1 µl 10× reakčního pufru s 9 µl destilované vody.

4.2.4 Použité primery

Primery použité při PCR amplifikaci a Sangerově sekvenování byly navrženy manuálně Mgr. Evou Dvořák Tomašíkovou, Ph.D. Seznam použitých primerů a jejich základní charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Seznam primerů určených pro PCR amplifikaci a Sangerovo sekvenování.

| Název | Sekvence 5' → 3' | Typ | Velikost PCR produktu [bp] |
|--------|----------------------|------|----------------------------|
| ET0419 | GCTTCCTCCACCAAAGGTTA | cDNA | 349 |
| ET0420 | AAGATTTTGCGGGTCAAGCT | | |
| ET0419 | GCTTCCTCCACCAAAGGTTA | gDNA | 937 |
| ET0420 | AAGATTTTGCGGGTCAAGCT | | |

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

4.3.1 Přístroje a zařízení

- Analytické váhy (Sartorius)
- Centrifuga MiniStar (VWR)
- Digitální předvážky Scout SC4010 (Ohaus)
- Fotoaparát Nikon, AF-S Micro (Nikon)
- Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
- Hlubokomrazicí box JOUAN pultový ULF 320 (Trigon-Plus)
- Horizontální elektroforéza MultiSUB Choice Trio se zdrojem napětí (Cleaver Scientific)
- Laboratorní digestoř M 1800 (Merci)
- Laminární box JOUAN MSC 9 (Trigon-Plus)
- Lednice RK (Gorenje)
- Míchačka vortex digit. (VWR)
- Mikrocentrifuga MicroStar 17R (VWR)
- Mikrovlnná trouba EMN (Zanussi)
- NanoDrop One spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific)
- Růstová komora (Percival Scientific)
- Termocykler T-Gradient (Biometra)
- Termomixer thermal (VWR)
- TissueLyser MM301 (Retsch)
- Transiluminátor InGenius 3 (Syngene)
- Třepačka vortex VV3 (VWR)
- Výrobník ledu (Brema)

4.3.2 Programy

- GeneSnap verze 7.12.06 (Syngene)
- ImageJ (Java)
- Microsoft Excel (Microsoft)
- SnapGene verze 6.0.2 (GSL Biotech LLC)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Sterilizace semen pro kontrolovaný výsev

Semena byla nejdříve přesypána do 1,5ml mikrozkušavek a následně přenesena do laminárního boxu, kde za sterilních podmínek pokračovala sterilizace semen. Do jednotlivých mikrozkušavek bylo přidáno 500 μ l 70% etanolu, ve kterém byla semena po dobu 5 minut a za mírného třepání inkubována. Po uplynutí 5 minut byl veškerý etanol odpipetován a do mikrozkušavek bylo přidáno 500 μ l 10% hypochloridu sodného s 0,01% Tween® 20. Semena byla s hypochloridem opět inkubována po dobu 5 minut za mírného třepání. Po odpipetování hypochloridu následovalo promývání semen v 500 μ l destilované vody. Tento krok byl po 5 minutách inkubace dvakrát opakován. K semenům byla přidána 0,1% agaróza, poté došlo ke stratifikaci v lednici po dobu 2 dnů při 4 °C.

4.4.2 Validace M₃ kandidátních linií rostlin EMS-mutagenizované populace

Po 2denní stratifikaci následoval výsev na 50ml Petriho misky s ½ MS médiem s 0,6% agarem a také na misky s ½ MS médiem obsahujícím 20 μ mol·l⁻¹ zebularin. Následně byly misky se vzorky inkubovány v růstové komoře Percival po dobu 7 dní.

Po uplynulém týdnu byly rostlinné linie jevící senzitivitu k zebularinu nataženy na 1% agarové médium a vyfotografovány pomocí fotoaparátu Nikon. Délka kořenů jednotlivých rostlin byla změřena v programu ImageJ a údaje získané z tohoto programu byly využity k určení průměrné délky kořenů rostlin rostoucích jak na klasickém médiu, tak i na médiu s obsahem zebularinu. K hlavnímu výběru zkoumaných linií rostlin však sloužil až poměr mezi těmito dvěma získanými průměry. Právě kandidátní linie prokazovaly redukci kořene minimálně o 60 %, zatímco rezistentní kontrola přibližně 40 %.

4.4.3 Křížení kandidátních linií rostlin

K upevňování mutací v genomu kandidátních linií rostlin a vytvoření mapovací populace bylo provedeno jejich zpětné křížení s mateřskými liniemi. Pokud rostliny vykazovaly senzitivní fenotyp, který odpovídal fenotypu některého ze známých mutantů zapojených v opravách zebularinem-indukovaných DPC, bylo provedeno i komplementační křížení s touto mutantní linií.

Jako první byly emaskulovány 3 nejstarší pupeny se zelenými či mírně žlutými prašníky. Další den byl na blizny emaskulovaných pupenů přenesen pyl z jiné linie. Zkřížené rostliny byly na 3 týdny přeneseny do fytotronové komory, ve které probíhalo zrání šešulí. Po jejich opatrném sběru byly zbylé rostliny přemístěny do skleníku.

Křížením kandidátních linií rostlin s kontrolní linií W35 (wild type) vznikli kříženci BCF₁ generace. Sesbíraná semena z této generace byla vyseta do hlíny a po samosprášení hybridních rostlin došlo k produkci BCF₂ semen, která představovala mapovací populaci. 1200 semen BCF₂ generace bylo vysázeno na ½ MS médium obsahující 20 μ mol·l⁻¹ zebularin a inkubováno po dobu 7 dní v růstové komoře Percival. K další analýze sloužily pouze fenotypově identické rostliny s výrazně redukovanými kořeny značící senzitivitu k zebularinu, a tudíž nesoucí zájmovou mutaci.

Při komplementačním křížení byla hybridní semena rovnou sázena na ½ MS médium obsahující 20 μmol·l⁻¹ zebularin a inkubována po dobu 7 dní v růstové komoře Percival.

4.4.4 Izolace gDNA

Pro izolaci gDNA sloužily 7denní rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Rostliny vložené do 1,5ml mikrozkušavek se zámkem a skleněnými kuličkami byly prudce zmrazeny v tekutém dusíku při -196 °C. Poté proběhla homogenizace pomocí TissueLyser MM301 po dobu 1 minuty a 30 sekund při frekvenci 30 Hz. Mikrozkušavky s homogenizovanými vzorky byly opět přeneseny do tekutého dusíku. Dále bylo u izolace gDNA postupováno podle protokolu soupravy GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit.

4.4.5 Izolace RNA

K izolaci RNA byly taktéž použity 7denní rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), avšak s tím rozdílem, že jejich maximální navážka musela činit 100 mg. Homogenizace vzorků probíhala stejně jako u izolace gDNA. Dále bylo u izolace RNA postupováno podle protokolu soupravy RNeasy® Plant Mini Kit (50).

4.4.6 Měření koncentrace a čistoty izolovaných nukleových kyselin

Po izolaci nukleových kyselin bylo nutné stanovit jejich koncentraci a čistotu pomocí spektrofotometru NanoDrop One. Na spektrofotometr byl pomocí automatické pipety přenášen 1 μl vzorku vyizolované nukleové kyseliny. Čistota byla určována z poměru hodnot absorbcí při vlnových délkách 260 a 280 nm. Čistá gDNA vykazovala hodnotu A260/A280 okolo 1,8 a RNA okolo 2.

4.4.7 Sekvenování nové generace (NGS)

Pro identifikaci kandidátního genu byla gDNA senzitivních rostlin BCF₂ generace odeslána ke komerčnímu sekvenování (Novogene LTD, Cambridge, UK). Analýza sekvenačních dat byla provedena Mgr. Evou Dvořák Tomašíkovou, Ph.D. dle Prochazkova *et al.*, 2022. Výstupné grafy byly taktéž vygenerovány vedoucí práce v programu RStudio (RStudio Team, 2020).

4.4.8 Syntéza cDNA

Při syntéze cDNA byl k 1 μg RNA přidán 1 μl Oligo(dT) primerů, směs byla doplněna Nuclease-free vodou na celkový objem 12 μl. V první části proběhla denaturace RNA po dobu 5 minut při 65 °C. K denaturované RNA byly přidány zbývající složky reakční směsi podle Tabulky 4. Samotná syntéza cDNA probíhala nejdříve 60 minut při 42 °C a poté 5 minut při 70 °C.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro syntézu cDNA.

| Složka reakční směsi | Koncentrace zásobního roztoku | Konečná koncentrace | Pipetovaný objem [μl] |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Reakční pufr | 5× | 2,5× | 4 |
| Ribolock RNase inhibitor | 20 U·μl ⁻¹ | 20 U/reakce | 1 |
| dNTPs | 10 mmol·l ⁻¹ | 2,5 mmol·l ⁻¹ | 2 |
| RevertAid reverzní transkriptáza | 200 U·μl ⁻¹ | 200 U/reakce | 1 |

4.4.9 Polymerázová řetězová reakce

Pro PCR amplifikaci konkrétního úseku DNA byla využita DreamTaq™ Green DNA polymeráza (Thermo Fisher Scientific). Nejdříve došlo k přípravě reakční směsi podle počtu vzorků. Jednotlivé složky a jejich objemy jsou uvedeny v Tabulce 5, použité primery jsou zaznamenány v Tabulce 3. K rozpipetované reakční směsi byla následně přidána templátová gDNA nebo cDNA, výsledný objem reakce byl 30 μl. Po přenesení jednotlivých vzorků do termocykleru T-Gradient byl nastaven program PCR reakce podle Tabulky 6.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci.

| Složka reakční směsi | Koncentrace zásobního roztoku | Konečná koncentrace | Pipetovaný objem [μl] (celkový objem reakce 30 μl) |
|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--|
| DreamTaq Green pufr | 10× | 1× | 3 |
| dNTP Mix | 2 mmol·l ⁻¹ | 0,2 mmol·l ⁻¹ | 3 |
| Forward primer | 10 μmol·l ⁻¹ | 0,5 μmol·l ⁻¹ | 1,5 |
| Reverse primer | 10 μmol·l ⁻¹ | 0,5 μmol·l ⁻¹ | 1,5 |
| DreamTaq™ Green DNA polymeráza | 5 U·μl ⁻¹ | 0,75 U/reakce | 0,15 |
| Destilovaná voda | | | 15,85 |
| Templátová DNA | | | 5 |

Tabulka 6: Program PCR reakce.

| Proces | Teplota [°C] | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|--------------|----------|-------------|
| Počáteční denaturace | 95 | 3 min | 1 |
| PCR amplifikace | 95 | 30 s | 35 |
| | 56 | 30 s | |
| | 72 | 1 min/kb | |
| Závěrečná elongace | 72 | 10 min | 1 |

4.4.10 Agarózová gelová elektroforéza

K separaci PCR produktů byla využita elektroforéza v 1% agarózovém gelu s etidium bromidem. Vedle jednotlivých vzorků byl do gelu napipetován i GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, který sloužil k přibližnému stanovení velikosti fragmentů PCR produktů. Elektroforetická separace probíhala po dobu 30 minut při napětí 100 V. Po jejím skončení byl gel přenesen do UV transiluminátoru InGenius 3, pomocí kterého byl pozorován výsledek.

4.4.11 Purifikace PCR reakční směsi

Pro další vyhodnocování bylo potřebné pracovat s opravdu čistou cDNA, tzn. zbavenou ostatních složek PCR reakční směsi. Při purifikaci bylo postupováno podle Tabulky 7. Z důvodu velmi malých objemů jednotlivých složek došlo nejdříve k přípravě purifikační směsi podle počtu vzorků. Následovalo rozpipetování purifikační směsi a přidání PCR reakční směsi, výsledný objem reakce byl 7 μl . Poté byly jednotlivé vzorky přeneseny k inkubaci do termocyklieru T-Gradient.

Tabulka 7: Složení purifikační směsi a program reakce pro purifikaci PCR reakční směsi.

| Složka reakční směsi | Pipetovaný objem [μl] (celkový objem reakce 7 μl) | Program reakce |
|----------------------------|---|--|
| Exonukleáza I | 0,05 | 30 min při 37 °C, poté 20 min při 80 °C |
| FastAP alkalická fosfatáza | 0,5 | |
| 1 \times reakční pufr | 2,45 | |
| PCR produkt | 4 | |

Před koncem inkubace byla připravena směs podle požadavků firmy SEQME (Tabulka 8). Tato směs obsahovala 2,5 μl 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku primerů a doporučené množství PCR produktu dle jeho délky, následovalo doplnění destilovanou vodou do celkového objemu 10 μl . Takto připravené vzorky byly odeslány na osekvenování.

Tabulka 8: Požadavky firmy SEQME pro sekvenování s použitím vlastních primerů.

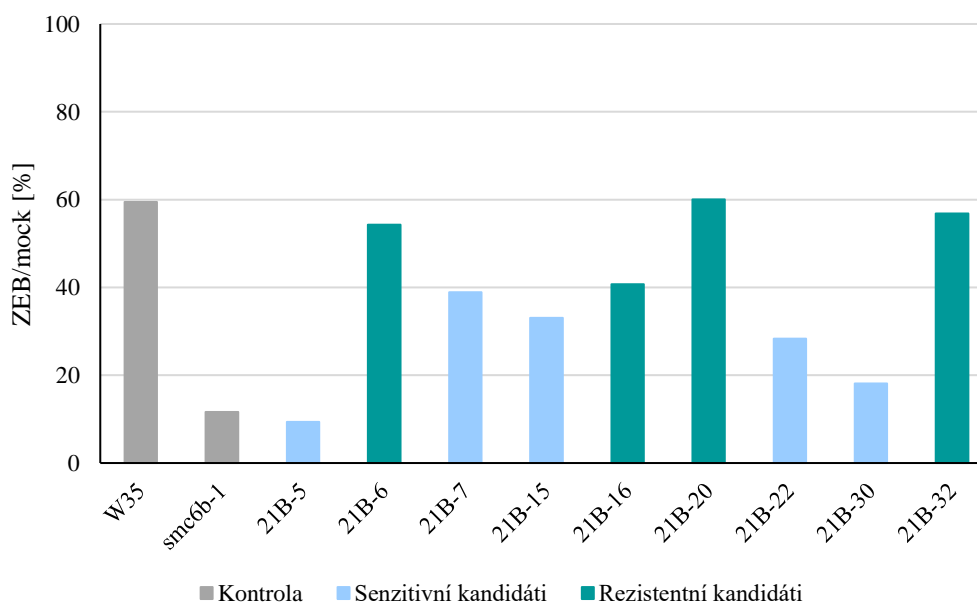
| Templát | Množství [ng] | Použité primery | Celkový objem [μl] |
|-----------------------------|---------------|--|---------------------------------|
| PCR produkt < 500 bp | 50 | 25 pmol (tj. 2,5 μl 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku primerů) | 10 |
| PCR produkt 500– 1000 bp | 100 | | |
| PCR produkt > 1000 bp | 200 | | |
| Plasmid | 500 | | |

5 VÝSLEDKY

5.1 Výběr pravých senzitivních linií 21B

Pro výběr senzitivních kandidátů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byla provedena validace semen M₃ generace na ½ MS médiu 0,6% agar (mock) a na médiu s přidavkem 20 μmol·l⁻¹ zebularinu. Jako kontrola rezistentní k zebularinu byla použita linie W35, u níž dochází k redukcí kořene o pouhých 40 %. U senzitivní kontroly *smc6b-1* bývají kořeny redukovány okolo 90 % oproti rostlinám rostoucím na médiu bez přidavku chemikálie.

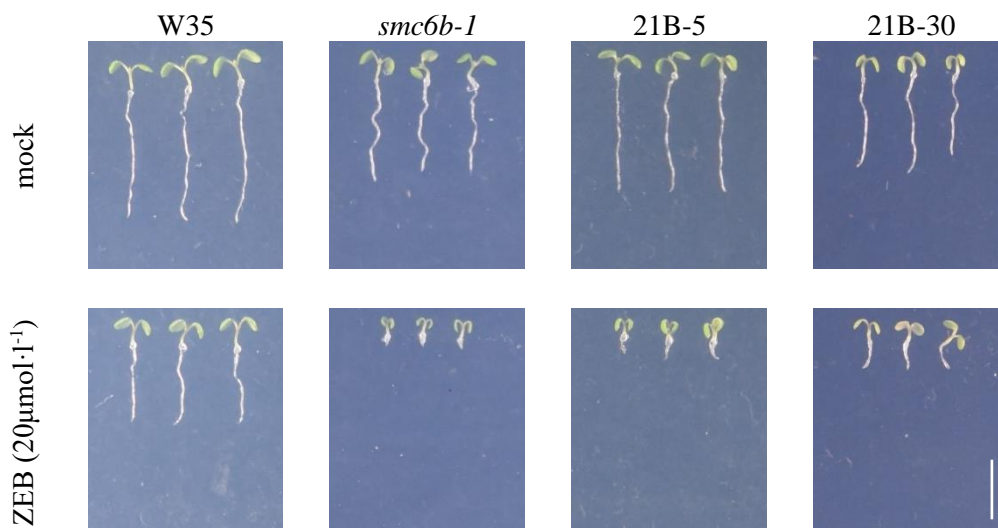
Kandidáti byli považováni za pravé v případě, kdy růstem na zebularinu vykazovali minimálně 60% redukcí délky kořene ve srovnání s délkou kořene dané linie rostoucí na médiu bez přidavku zebularinu. Díky tomuto kritériu bylo při analýze délky kořenů vybráno 5 kandidátních linií – 21B-5, 21B-7, 21B-15, 21B-22 a 21B-30, zbylé linie byly vyřazeny (Obrázek 6). V případě první kandidátní linie 21B-5 došlo až k 90% redukcí délky kořene, což poukazovalo na vysokou citlivost k zebularinu a udělalo to z ní přednostně kandidáta číslo 1. Kandidátní linie 21B-30 vykazovala druhou nejvýraznější redukcí kořene, a to o 82 %. U dalších kandidátů nebyla redukce zas až tak výrazná, ale stále odpovídala požadavkům analýzy. Provedením validace semen M₄ generace se ale většina kandidátních linií prokázala jako falešně senzitivní, proto byly v dalších experimentech využity jen linie 21B-5 a 21B-30. Jednotlivé fenotypové projevy kandidátních linií lze vidět na Obrázku 7.



Obrázek 6: Výběr senzitivních kandidátních linií na základě analýzy délky kořenů.

Kvantitativní údaje o délkách kořenů kandidátních a některých vyřazených linií rostlin 21B. Analýza byla provedena z 10 rostlin od každé linie.

Světle modrá – zvalidované kandidátní linie 21B (senzitivní k zebularinu), **tmavě modrá** – vyřazené linie 21B (rezistentní k zebularinu).



Obrázek 7: Fenotypy vybraných kandidátních linií senzitivních k zebularinu.

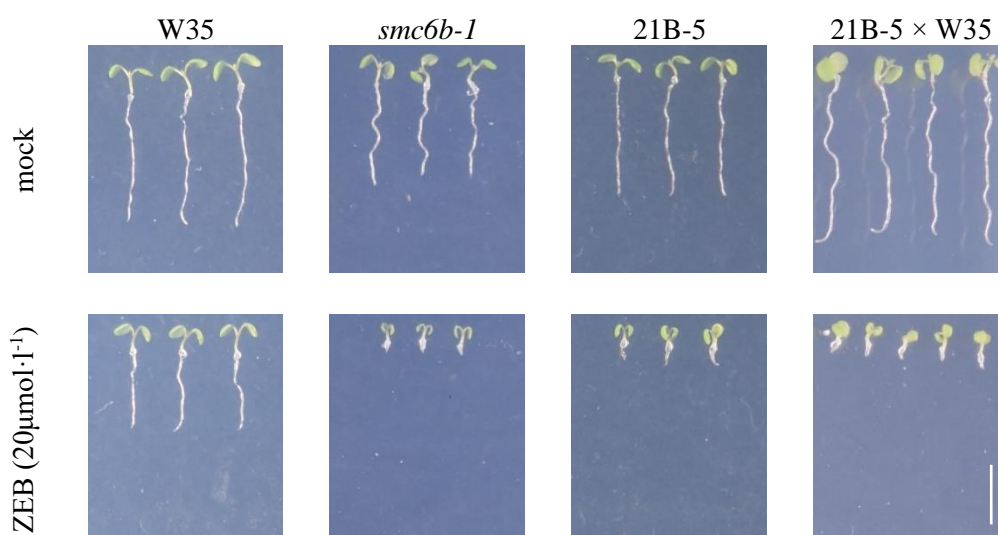
Semena byla vyseta na čisté médium (mock) a médium s $20\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinem (ZEB). Fenotypy rostlin byly analyzovány po 7 dnech.

W35 – rezistentní kontrola, ***smc6b-1*** – senzitivní kontrola, **21B-5 a 21B-30** – kandidátní linie používané v dalších experimentech. **Měřítko** – 1 cm.

5.2 Příprava mapovací populace u kandidátní linie 21B-5 a identifikace zasaženého genu

Za účelem identifikace kauzálního genu byla vytvořena mapovací populace, kdy došlo ke zkřížení kandidátní linie 21B-5 s kontrolní linií W35, která byla rezistentní k zebularinu. Vzniklá semena BCF₁ generace se vysela do hlíny a po samosprášení těchto hybridních rostlin následovala produkce semen BCF₂ generace mapovací populace.

1200 semen mapovací populace BCF₂ bylo sázeno na ½ MS médium 0,6% agar s přidavkem 20 μmol·l⁻¹ zebularinu, 100 semen pak bylo sázeno na čisté ½ MS médium 0,6% agar. Po vyklíčení semen došlo k segregaci rostlinných fenotypů, díky čemuž bylo dohromady vybráno pouze okolo 80 senzitivních rostlin nejvíce odpovídajících fenotypu mateřské rostliny 21B-5. Ukázku recesivního fenotypu BCF₂ generace 21B-5 × W35 lze vidět na Obrázku 8. Z těchto rostlin byla vyizolována gDNA, která se po ověření koncentrace (c = 8 ng·μl⁻¹) poslala na celogenomové osekvenování. Sekvenační data byla využita ke zmapování mutace, díky kterému byl identifikován zasažený gen.

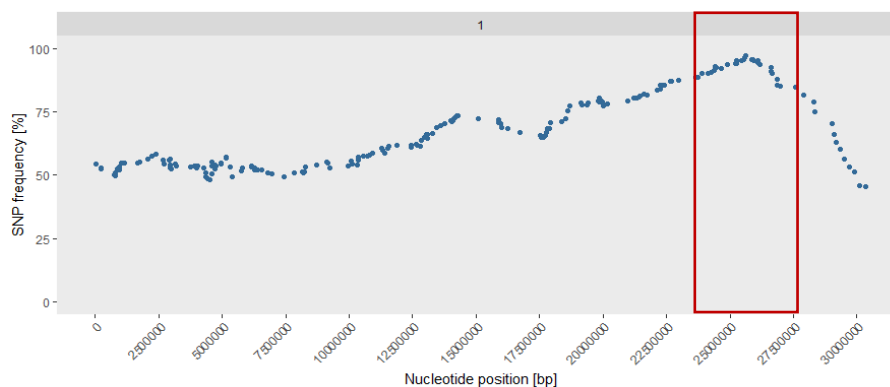


Obrázek 8: Fenotyp kandidátní linie 21B-5 a BCF₂ mapovací populace.

Po samosprášení hybridních rostlin 21B-5 × W35 byla vytvořena mapovací populace. Semena byla vyseta na čisté médium (mock) a médium s 20 μmol·l⁻¹ zebularinem (ZEB). Fenotypy rostlin byly analyzovány po 7 dnech.

W35 – rezistentní kontrola, **smc6b-1** – senzitivní kontrola, **21B-5** – kandidátní linie, **21B-5 × W35** – BCF₂ mapovací populace. **Měřítka** – 1 cm.

Z výsledků sekvenační analýzy bylo zjištěno, že se mutace u kandidáta 21B-5 nacházela v distální části chromozomu 1 (Obrázek 9). Podrobnější analýzou sekvenačních dat se jako nejpravděpodobnější mutace, zodpovědná za senzitivitu k zebularinu, jevila mutace v genu *DPCR7*. V tomto genu došlo k bodové mutaci vedoucí k nesynonymní substituci báze G za A, která měla za následek narušení v místě sestříhu intronu 5 (Tabulka 9).



Obrázek 9: Graf frekvence výskytu jednonukleotidového polymorfismu (SNP) kandidáta 21B-5 na chromozomu 1.

Tato frekvence jednonukleotidového polymorfismu byla získána osekvenováním gDNA přibližně 80 rostlin vybraných z BCF₂ generace 21B-5 × W35, které vykazovaly senzitivitu k zebularinu. Jednotlivé tečky představují frekvenci mutantních alel vypočítanou jako průměr 11 po sobě jdoucích a vysoce spolehlivých SNP. Hlavní kandidátní oblast v koncové části chromozomu 1 je ohraničena červeným rámečkem.

Tabulka 9: Kandidátní SNP v lokalizované oblasti chromozomu 1.

| CHROMOZOM | POZICE | PHRED | FREKVENCE | REF | ALT | EFEKT | DOPAD |
|-----------|----------|-------|-----------|-----|-----|-------------------------------------|----------|
| 1 | 24894102 | 10 | 19 | G | T | upstream_gene_variant | MODIFIER |
| 1 | 25221092 | 228 | 100 | G | NA | NA | NA |
| 1 | 25266880 | 228 | 95 | G | A | missense_variant | MODERATE |
| 1 | 25273045 | 228 | 100 | G | A | missense_variant | MODERATE |
| 1 | 25444034 | 228 | 97 | G | A | downstream_gene_variant | MODIFIER |
| 1 | 25557554 | 228 | 100 | G | A | splice_donor_variant&intron_variant | HIGH |
| 1 | 25586148 | 228 | 100 | G | A | intron_variant | MODIFIER |
| 1 | 25615260 | 228 | 100 | G | A | stop_gained | HIGH |
| 1 | 25846440 | 221 | 80 | A | T | 3_prime_UTR_variant | MODIFIER |
| 1 | 25882808 | 219 | 88 | G | A | missense_variant | MODERATE |
| 1 | 25945638 | 228 | 91 | G | A | synonymous_variant | LOW |
| 1 | 26111174 | 228 | 96 | G | A | upstream_gene_variant | MODIFIER |
| 1 | 26117818 | 228 | 92 | G | A | 5_prime_UTR_variant | MODIFIER |
| 1 | 26167794 | 219 | 88 | G | NA | NA | NA |
| 1 | 26481618 | 15 | 23 | G | T | 5_prime_UTR_variant | MODIFIER |
| 1 | 26601537 | 220 | 84 | G | NA | NA | NA |
| 1 | 26627000 | 221 | 81 | G | A | splice_donor_variant&intron_variant | HIGH |
| 1 | 26666704 | 228 | 91 | G | A | missense_variant | MODERATE |
| 1 | 26720458 | 4 | 20 | A | NA | NA | NA |
| 1 | 26856034 | 221 | 78 | C | T | intron_variant | MODIFIER |
| 1 | 26856166 | 221 | 74 | C | T | missense_variant | MODERATE |
| 1 | 26994056 | 221 | 74 | G | A | intron_variant | MODIFIER |

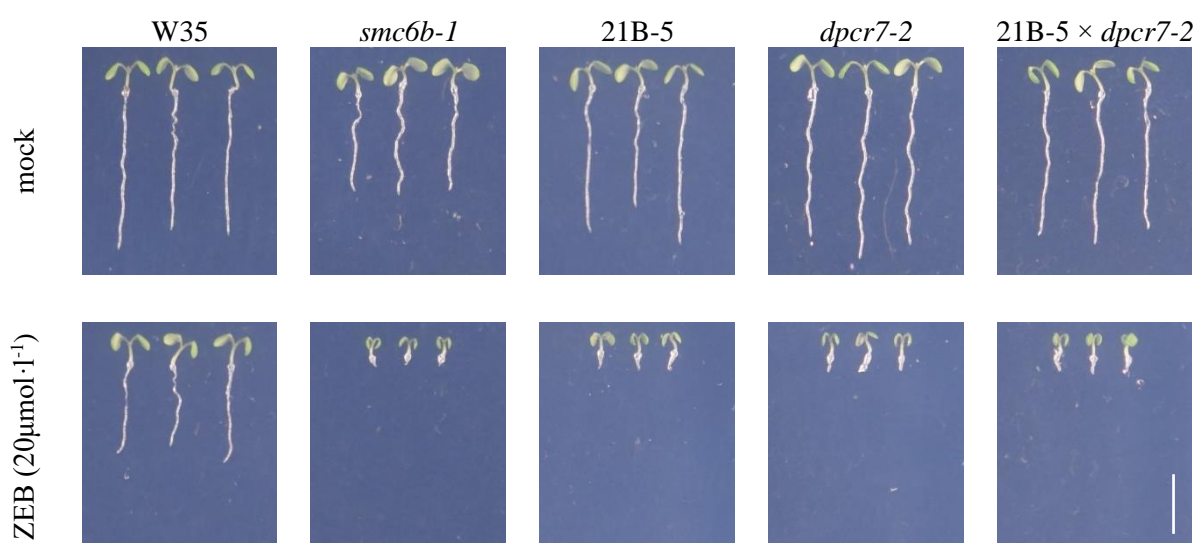
Přísné filtrování spolehlivých a vysokofrekvenčních mutací vedlo k identifikaci kandidátního genu *DPCR7* (modře zvýrazněný), vykazujícího sestřihovou variantu & intron variantu mutace se 100% frekvencí výskytu mutace.

PHRED – skóre kvality sekvenování, **REF** – nukleotid v referenční sekvenci, **ALT** – změněný nukleotid.

5.3 Ověření mutace v genu pomocí komplementačního křížení

K ověření potenciálně kauzální mutace v genu *DPCR7* u kandidáta 21B-5 byla použita specifická T-DNA inzerční linie *dpcr7-2*, která nesla mutaci ve stejném genu. Tato linie byla objednána z databáze NASC a poskytnuta Bc. Jaroslavem Fil'om, který se stejnou linií pracoval ve své diplomové práci.

Po provedeném komplementačním křížení linií byla vzniklá hybridní semena 21B-5 × *dpcr7-2* otestována na ½ MS médiu 0,8% agar a na médiu s přidavkem 20 μmol·l⁻¹ zebularinu. Z výsledného fenotypu zkřížených rostlin (Obrázek 10) bylo zřejmé, že u obou linií leží mutace v genu *DPCR7*, jelikož všechny rostliny vykazovaly vysokou senzitivitu k zebularinu, a navíc byly fenotypově identické s rodičovskými rostlinami. Předmětem dalších experimentů bylo identifikovat, jaký vliv měla tato mutace na editaci primárního transkriptu.



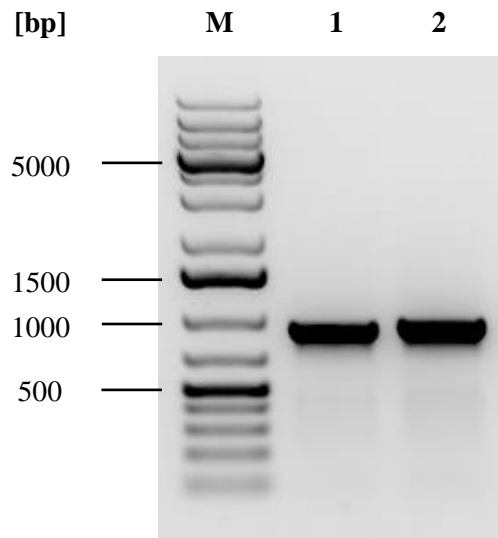
Obrázek 10: Fenotyp kandidátní linie 21B-5 a jedince vzniklého komplementačním křížením.

Komplementační křížení kandidátní linie 21B-5 s T-DNA linií *dpcr7-2*. Semena byla vyseta na čisté médium (mock) a médium s 20 μmol·l⁻¹ zebularinem (ZEB). Fenotypy rostlin byly analyzovány po 7 dnech. Došlo k 100% zisku rostlin se senzitivním fenotypem.

W35 – rezistentní kontrola, ***smc6b-1*** – senzitivní kontrola, **21B-5** – kandidátní linie, ***dpcr7-2*** – T-DNA linie rostlin, **21B-5 × *dpcr7-2*** – hybridní jedinec vzniklý komplementačním křížením. **Měřítka** – 1 cm.

5.4 Ověření pozice mutace pomocí Sangerova sekvenování

Na základě celogenomového sekvenování bylo stanoveno, že se mutace nachází na počátku intronu 5 v genu *DPCR7*. Pro ověření tohoto tvrzení bylo zapotřebí vyizolovat gDNA jak z kontrolní linie W35, tak i z linie 21B-5 nesoucí mutaci. Pomocí specificky navržených primerů ET0419 a ET0420, umístěných na exonech 4 a 6, byla kauzální oblast amplifikována a následně elektroforeticky separována. Dle předpokladů byla výsledná velikost obou produktů 937 bp (Obrázek 11). Následně byla PCR reakční směs s gDNA produkty obou linií purifikována a poslána na osekvenování firmou SEQME.



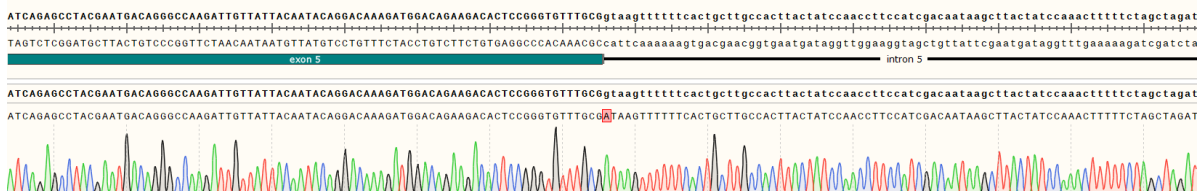
Obrázek 11: Elektroforetická separace PCR produktů gDNA linií W35 a 21B-5 s očekávanou velikostí. U PCR produktů gDNA linií W35 a 21B-5 bylo dosaženo očekávané velikosti 937 bp. **M** – marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, **1** – linie W35, **2** – linie 21B-5.

Porovnáním referenční sekvence W35 se sekvencí kandidáta 21B-5 bylo potvrzeno, že vlivem mutace došlo k záměně báze guaninu za adenin na začátku intronu 5, tzn. v sestřihové oblasti genu (Obrázek 12). Schématické srovnání referenční sekvence se sekvencí genu *DPCR7* lze vidět na Obrázku 13.



Obrázek 12: Schéma genu *DPCR7* kandidátní linie 21B-5 s očekávanou sestřihovou variantou mutace. Dle výsledků došlo k mutaci, která způsobuje záměnu báze G za A na začátku 5. intronu genu *DPCR7* kandidátní linie 21B-5.

Tmavě modré oblasti – exony, **přerušovaná čára** – introny, **červená značka** – jednonukleotidová záměna guaninu za adenin.



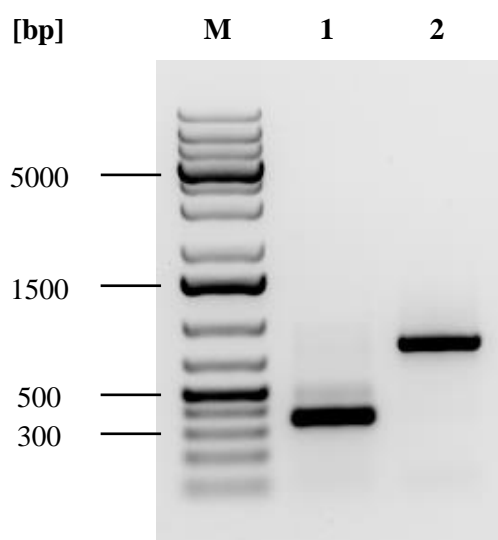
Obrázek 13: Schématické porovnání sekvencí gDNA kontrolní linie W35 s kandidátními linií 21B-5.

Znázorněná mutace v gDNA linie 21B-5 nacházející se v místě sestřihu.

Horní pruh – referenční sekvence gDNA linie W35, **dolní pruh** – sekvence mutantní gDNA linie 21B-5.

5.5 Charakterizace efektu mutace na výsledný transkript pomocí Sangerova sekvenování

K charakterizaci efektu mutace na editaci primárního transkriptu bylo zapotřebí vyizolovat RNA taktéž z kontrolní linie W35 a kandidátní linie 21B-5. Vyizolovaná RNA byla následně převedena na cDNA a amplifikována opět pomocí specifických primerů ET0419 a ET0420, kterými byla ohraničena oblast zájmu. Po elektroforetické separaci ale byly získány produkty o rozdílných velikostech. Zatímco u linie W35 byl získán produkt s očekávanou velikostí 349 bp, u linie 21B-5 to byl produkt výrazně větší (Obrázek 14). Po provedené elektroforéze byla PCR reakční směs s cDNA produkty obou linií purifikována a poslána na osekvenování firmou SEQME.



Obrázek 14: Elektroforetická separace PCR produktů cDNA linií W35 a 21B-5 s rozdílnou velikostí.

PCR produkty cDNA linií W35 a 21B-5 dosahovaly odlišných velikostí. Očekávaná velikost obou PCR produktů byla 349 bp, což odpovídalo produktu linie W35. Produkt linie 21B-5 byl daleko větší.

M – marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, **1** – linie W35, **2** – linie 21B-5.

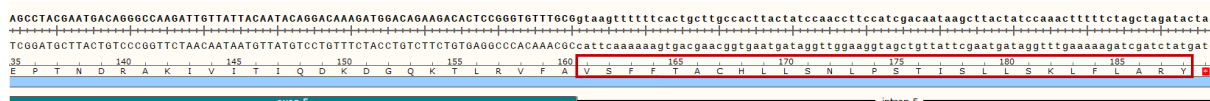
Z porovnaných sekvencí cDNA (Obrázek 15) bylo zjištěno, že jednonukleotidová substituce vedla k nevystřížení celého intronu 5, jež byl stále součástí sekvence transkriptu. Během proteosyntézy pak sice došlo k přiřazení několika náhodných aminokyselin do nadbytečné oblasti intronu, v určité fázi ale vznikl terminační kodon (Obrázek 16). Předčasně ukončená syntéza produktu způsobila, že byl výsledný protein nefunkční a nemohl vykonat svou roli při opravě poškozené DNA.



Obrázek 15: Schématické porovnání sekvencí cDNA kontrolní linie W35 s kandidátní linií 21B-5.

Vlivem záměny báze G za A nedošlo k vystřížení intronu 5 v genu *DPCR7* u kandidátní linie 21B-5.

Horní pruh – referenční sekvence cDNA linie W35, **dolní pruh** – sekvence mutantní cDNA linie 21B-5.



Obrázek 16: Vznik předčasného terminačního kodonu v oblasti intronu 5 během syntézy proteinu *DPCR7*.

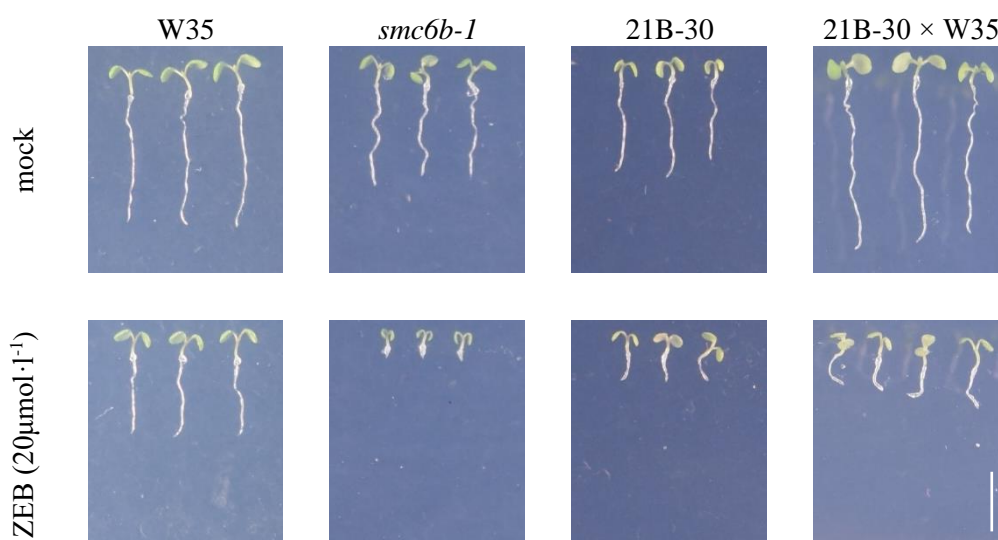
Po přiřazení několika náhodných aminokyselin v oblasti intronu (ohraňeny červeným rámečkem) byl přiřazen terminační kodon, čímž došlo k předčasnému ukončení proteosyntézy a vzniku nefunkčního proteinu.

Světle modrý pruh – sekvence aminokyselin v produktu proteosyntézy genu *DPCR7*, **tmavě modrý pruh** – sekvence aminokyselin u nemutovaného produktu proteosyntézy, **černý pruh** – nepřekládaná oblast.

5.6 Kandidátní linie 21B-30

Jelikož linie 21B-30 vykazovala druhou nejvýraznější senzitivitu k zebularinu hned po kandidátní linii 21B-5, také u ní byla vytvořena mapovací populace za účelem identifikace kauzálního genu.

Po vysázení a vyklíčení hybridních rostlin BCF₂ generace bylo opět vybráno pouze okolo 80 senzitivních rostlin odpovídajících fenotypu mateřské rostliny 21B-30. Ukázkou recesivního fenotypu BCF₂ generace 21B-30 × W35 lze vidět na Obrázku 17. Z těchto rostlin byla vyizolována gDNA, která se po ověření koncentrace ($c = 20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) poslala na celogenomové osekvenování. Sekvenační data byla využita ke zmapování mutace.

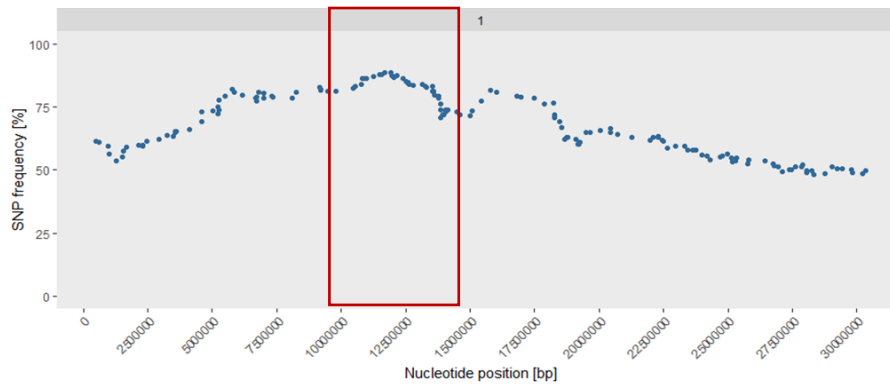


Obrázek 17: Fenotyp kandidátní linie 21B-30 a BCF₂ mapovací populace.

Po samosprášení hybridních rostlin 21B-30 × W35 byla vytvořena mapovací populace. Semena byla vyseta na čisté médium (mock) a médium s $20 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zebularinem (ZEB). Fenotypy rostlin byly analyzovány po 7 dnech.

W35 – rezistentní kontrola, **smc6b-1** – senzitivní kontrola, **21B-30** – kandidátní linie, **21B-30 × W35** – BCF₂ mapovací populace. **Měřítka** – 1 cm.

Z výsledků sekvenační analýzy bylo zjištěno, že se mutace u kandidáta 21B-30 nacházela poblíž centromerické oblasti chromozomu 1 (Obrázek 18). Dle kritérií výběru mutací byly předpovězeny 2 kandidátní geny, které by mohly být zodpovědné za senzitivní fenotyp u rostlin huseníčku. Jednalo se o geny *ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1 (ADR1)* a *PARALLEL SPINDLE 1 (PSI)* (Tabulka 10). Z časových důvodů však nedošlo k prověření potenciálně kauzálních mutací, a proto budou kandidáti z linie 21B-30 předmětem dalších analýz.



Obrázek 18: Graf frekvence výskytu jednonukleotidového polymorfismu (SNP) kandidáta 21B-30 na chromozomu 1.

Tato frekvence jednonukleotidového polymorfismu byla získána osekvenováním gDNA přibližně 80 rostlin vybraných z BCF₂ generace 21B-30 × W35, které vykazovaly senzitivitu k zebularinu. Jednotlivé tečky představují frekvenci mutantních alel vypočítanou jako průměr 11 po sobě jdoucích a vysoce spolehlivých SNP. Hlavní kandidátní oblast poblíž centromerické oblasti chromozomu 1 je ohraničena červeným rámečkem.

Tabulka 10: Dva kandidátní SNP v lokalizované oblasti chromozomu 1.

| CHROMOZOM | POZICE | PHRED | FREKVENCE | REF | ALT | EFEKT | DOPAD |
|-----------|----------|-------|-----------|-----|-----|--|----------|
| 1 | 10471512 | 219 | 89 | G | A | missense_variant | MODERATE |
| 1 | 10529556 | 181 | 88 | G | NA | NA | NA |
| 1 | 10763226 | 219 | 85 | G | A | intron_variant | MODIFIER |
| 1 | 10836543 | 228 | 98 | G | A | missense_variant | MODERATE |
| 1 | 10883875 | 223 | 91 | G | A | intron_variant | MODIFIER |
| 1 | 10961424 | 219 | 85 | G | A | splice_region_variant&synonymous_variant | LOW |
| 1 | 11238187 | 228 | 94 | G | A | downstream_gene_variant | MODIFIER |
| 1 | 11469265 | 218 | 88 | G | A | upstream_gene_variant | MODIFIER |
| 1 | 11551897 | 219 | 87 | G | NA | NA | NA |
| 1 | 11697810 | 220 | 86 | G | A | missense_variant | MODERATE |
| 1 | 11919776 | 219 | 86 | G | NA | NA | NA |
| 1 | 11962411 | 221 | 76 | G | A | upstream_gene_variant | MODIFIER |
| 1 | 12050495 | 221 | 78 | G | A | downstream_gene_variant | MODIFIER |
| 1 | 12170481 | 228 | 93 | G | A | missense_variant | MODERATE |
| 1 | 12401546 | 220 | 84 | G | NA | NA | NA |
| 1 | 12514835 | 203 | 81 | C | T | missense_variant | MODERATE |
| 1 | 12539113 | 220 | 81 | G | A | missense_variant | MODERATE |
| 1 | 12576485 | 228 | 92 | G | A | upstream_gene_variant | MODIFIER |
| 1 | 12651804 | 220 | 83 | G | A | intron_variant | MODIFIER |
| 1 | 12804933 | 116 | 83 | G | A | missense_variant | MODERATE |

Přísné filtrování spolehlivých a vysokofrekvenčních mutací vedlo k vytipování 2 nejpravděpodobnějších kandidátních genů *ADRI* s frekvencí výskytu mutace 93 % a u genu *PSI* 81 % (modře zvýrazněné). Oba kandidáti vykazují missense variantu mutace.

PHRED – skóre kvality sekvenování, **REF** – nukleotid v referenční sekvenci, **ALT** – změněný nukleotid.

6 DISKUSE

Pro zachování stability a struktury genetického materiálu musí být organismy schopny vypořádat se s různými typy poškození DNA. Jedno z nejzávažnějších poškození představují i toxické DNA-proteinové crosslinky (DPC), kdy jsou proteiny vyskytující se v okolí chromatinu kovalentně spojeny s molekulou DNA následkem působení různých crosslinkačních činidel (Enderle *et al.*, 2019). Takovým činidlem může být mimo jiné i cytidinový analog zebularin, jehož účinky byly studovány na huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*). Již dříve bylo prokázáno, že pokud jsou rostliny vystaveny účinkům zebularinu, nedochází pouze ke snížení metylace DNA, ale po krátkodobé expozici také k významné upregulaci 31 genů, z nichž je zhruba třetina spojených s metabolismem a opravou poškození DNA. Jednalo se například o geny *BREAST CANCER SUSCEPTIBLE 1 (BRCA1)* nebo *RAS ASSOCIATED WITH DIABETES 51 (RAD51)* (Liu *et al.*, 2015; Nowicka *et al.*, 2020). Nově byl tento analog identifikován jako crosslinkační činidlo u huseníčku, jenž po inkorporaci do DNA během replikace specificky váže METYLTRANSFERÁZU 1 (MET1) (Prochazkova *et al.*, 2022). Z toho důvodu se o opravných mechanismech zebularinem indukovaných DPC zatím moc neví. Zřejmé ovšem je, že neopravené DPC vedou vlivem proteinové překážky k zastavení běžných procesů udržujících integritu genomu (Nowicka *et al.*, 2020; Prochazkova *et al.*, 2022).

Myšlenka identifikace nových genů, které hrají roli v opravách DPC vedla ke vzniku dopředně řízeného genetického screenu. Pro zahájení tohoto výzkumu bylo nutné vytvořit EMS-mutagenizovanou populaci (Kruska, 2017). Náhodná jednonukleotidová mutagenese pomocí EMS činidla umožňuje studovat geny pomocí dopředné genetiky. Následkem změny v genomu totiž nejprve dochází ke vzniku specifických fenotypů rostlin vykazujících zřetelnou redukci kořene vůči určité chemikálii a až poté jsou identifikovány geny způsobující tento vzhled. Reverzní genetika pracuje na opačném principu, kdy jsou nejprve nalezeny kauzální geny, ke kterým se přiřazují fenotypy. Často se ale nepodaří nalézt správný podnět pro identifikaci naprosto nových faktorů zapojených v konkrétních procesech, což zvyhodňuje postupy dopředné genetiky, a tím pádem i postupy vysoce specifického genetického screenu (Espina *et al.*, 2018).

Analyzována byla M_3 generace linie 21B huseníčku, která byla získána výběrem primárních kandidátů z M_2 generace rostlin. Vzhledem k tomu, že v této první fázi výběru jsou M_2 rostliny vybírány pouze na základě délky kořene na zebularinu, dochází často k nespecifickému výběru kandidátních rostlin. Rostliny mohou mít například mutaci v genu zodpovědném za růst kořene, která ale nijak nesouvisí se senzitivitou k zebularinu. Proto je nutné semena těchto primárních kandidátů podrobit několika validacím na senzitivitu k zebularinu, které odhalí pouze pravé kandidáty. Tímto způsobem byli získáni kandidáti 21B-5 a 21B-30, kteří sloužili k výsledné identifikaci genů zapojených v opravách DPC. Z dat získaných sekvenační analýzou genomu kandidáta 21B-5 bylo zřejmé, že se kauzální mutace nachází v koncové části chromozomu 1. Stringentním filtrováním jednotlivých SNP byl jako nejpravděpodobnější kandidátní gen identifikován *DPCR7*, který se po ověření pomocí

komplementačního křížení prokázal jako kauzální. Následující experimenty vedly k charakterizaci efektu mutace na úrovni transkriptu, jelikož se jednalo o sestřihovou mutaci, tzn. že došlo k substituci bázi na hranici mezi exonem a intronem. Osekvenováním cDNA z mutantních rostlin došlo k zjištění, že spliceozom přehlédl změněnou bázi a díky tomu nedošlo k vystřížení intronu 5. Zachování intronu vedlo ke změně čtecího rámce a eventuálně vzniku stop kodonu.

Stejně jako u linie 21B-5 i u kandidáta 21B-30 byla provedena sekvenační analýza. V prvním případě byl potenciální kauzální gen nalezen poměrně jednoznačně, protože se jednalo o další alelu již známého genu identifikovaného v našem genetickém screenu. U linie 21B-30 však nebyla situace úplně jasná. Dle polohy s nejvyššími frekvencemi SNP a efektu daných mutací bylo vybráno několik potenciálních genů, které mohly být zodpovědné za senzitivní fenotyp rostlin. Z databáze NASC byly objednány T-DNA mutantní linie, vzhledem k časové náročnosti experimentu však nebylo možné analýzu dokončit. Mezi vybranými kandidáty byly geny *ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1 (ADRI)* a *PARALLEL SPINDLE 1 (PSI)*. *ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1* patří do stejnojmenné rodiny proteinů, která souvisí s obrannou reakcí. Gen *ADRI* kóduje produkt mající řadu klíčových znaků, včetně homologie se subdoménami protein kináz, nukleotidové vazebné domény a repetice bohaté na leucin. Přechodná exprese tohoto genu zprostředkovává pozoruhodnou odolnost vůči chorobám ve spojitosti s akumulovanou kyselinou salicylovou (Grant *et al.*, 2003). Již v rámci jiné studie bylo prokázáno, že přítomnost kyseliny salicylové indukuje expresi obranných genů a zvýšenou rychlost homologní rekombinace (HR), jakožto jedné z cest oprav poškozené DNA. Opravná dráha je přitom závislá na podjednotce SUPPRESSOR OF *npr1-1*, INDUCIBLE 1 (SNI1) komplexu STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 5/6 (SMC5/6), o němž samotném je známo, že udržuje integritu genomu (Watanabe *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2013). Zda má produkt genu *ADRI* podobnou roli jako SNI1, je momentálně předmětem spekulací. *PARALLEL SPINDLE 1*, nesoucí domény naznačující regulační funkci, je konzervován v celé rostlinné říši. U huseníčku hraje roli především při rozchodu chromozomů v meióze II. Pokud je však tento gen mutován, dochází k abnormální orientaci vřeténka a u samců tím pádem vznikají diploidní gamety (d'Erfurth *et al.*, 2008). Spojitost genu *PSI* s meiózou nás navedla na myšlenku, že by se gen mohl účastnit reparačních drah během crossing-overu, kdy musí nejprve vzniknout DSB, než dojde k výměně nesesterských chromatid. Jestli by tomu tak doopravdy bylo, reparační faktory by mohly fungovat i v somatických opravách.

Identifikovaný gen *DPCR7* není zdaleka jediným faktorem, který se účastní oprav tohoto specifického poškození DNA. V laboratoři doc. Pečinky byla již dříve testována senzitivita různých mutantů vůči zebularinu. Výsledky prokázaly roli dvou evolučně konzervovaných kináz ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED (ATM) a ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD3-RELATED (ATR) v signalizaci zebularinem indukovaného poškození DNA, která vedla k opravám pomocí HR (Liu *et al.*, 2015). Stále však neexistuje dostatek informací pro pochopení povahy oprav DPC vyvolaných zebularinem, a proto stále probíhá identifikace nových kandidátů pomocí dopředného

genetického screenu. V rámci bakalářské práce byly identifikovány geny, které jsou zapojeny do oprav DNA-proteinových crosslinků indukovaných zebularinem. Získáním poznatků o vlastnostech a využití těchto genů by mohlo v budoucnu napomoci objasnění molekulárního mechanismu oprav DNA-proteinových crosslinků u huseníčku.

7 ZÁVĚR

K identifikaci nových genů podílejících se na opravách DNA-proteinových crosslinků u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byly pomocí dopředného genetického screenu analyzovány populace rostlin mutagenizované EMS činidlem.

Celkem bylo otestováno 58 M₃ populací semen z rostlinné linie 21B. Hned po prvotní fázi validace však došlo k vyřazení většiny linií, jelikož neprokazovaly specifickou senzitivitu ke crosslinkačnímu činidlu zebularinu. Stringentní selekcí jednotlivých fenotypů byly získány linie 21B-5 a 21B-30, které sloužily k dalším analýzám.

Linie 21B-5, která projevovala vysokou senzitivitu k zebularinu ve všech případech testování, se stala přednostním kandidátem. Pro identifikaci mutace kauzálního genu byla vytvořena mapovací populace BCF₂, z níž byly vybrány pouze rostliny s velmi krátkými kořeny představující recesivní fenotyp. Po nalezení a následném potvrzení kauzální mutace v genu *DPCR7* pomocí sekvenování byl charakterizován dopad mutace na editaci primárního transkriptu. Vlivem jednonukleotidové substituce na začátku intronu 5 nedošlo k jeho vystřížení a tím pádem zůstal součástí proteinového produktu. To způsobilo jeho disfunkci při opravách DNA-proteinových crosslinků.

U linie 21B-30 bylo taktéž provedeno sekvenování BCF₂ mapovací populace. Na základě analýzy frekvence jednonukleotidových polymorfismů se očekává výskyt kauzální mutace poblíž centromerické oblasti chromozomu 1. Kandidátní gen však nebyl doposud identifikován, a proto bude tato linie dále experimentálně zkoumána.

8 LITERATURA

- Baker N. M., Rajan R., Mondragón A. (2009): Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic Acids Research* 37: 693–701.
- Baubec T., Pecinka A., Rozhon W., Scheid O. M. (2009): Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine. *The Plant Journal* 57: 542–554.
- Ben-Kasus T., Ben-Zvi Z., Marquez V. E., Kelley J. A., Agbaria R. (2005): Metabolic activation of zebularine, a novel DNA methylation inhibitor, in human bladder carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology* 70: 121–133.
- Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J. L. (2005): Radiation-induced damage to cellular DNA: measurement and biological role. *Radiation Physics and Chemistry* 72: 293–299.
- Caldecott K. W. (2008): Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews. Genetics* 9: 619–631.
- d'Erfurth I., Jolivet S., Froger N., Catrice O., Novatchkova M., Simon M., Jenczewski E., Mercier R. (2008): Mutations in *AtPSI* (*Arabidopsis thaliana* Parallel Spindle 1) Lead to the Production of Diploid Pollen Grains. *PLoS Genetics* 4: e1000274.
- Dianov G. L., Parsons J. L. (2007): Co-ordination of DNA single strand break repair. *DNA Repair* 6: 454–460.
- Dowd C. L., Sutch B. T., Haworth I. S., Eritja R., Marquez V. E., Yang A. S. (2008): Incorporation of Zebularine from its 2'-Deoxyribonucleoside Triphosphate Derivative and Activity as a Template-Coding Nucleobase. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 27: 131–145.
- Enderle J., Dorn A., Beying N., Trapp O., Puchta H. (2019): The Protease WSS1A, the Endonuclease MUS81, and the Phosphodiesterase TDP1 Are Involved in Independent Pathways of DNA-protein Crosslink Repair in Plants. *The Plant Cell* 31: 775–790.
- Ensminger M., Iloff L., Ebel C., Nikolova T., Kaina B., Löbrich M. (2014): DNA breaks and chromosomal aberrations arise when replication meets base excision repair. *The Journal of cell biology* 206: 29–43.
- Espina M. J., Ahmed C. M. S., Bernardini A., Adeleke E., Yadegari Z., Arelli P., Pantalone V., Taheri A. (2018): Development and Phenotypic Screening of an Ethyl Methane Sulfonate Mutant Population in Soybean. *Frontiers in Plant Science* 9: 394.
- Finnegan E. J., Peacock W. J., Dennis E. S. (1996): Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 8449–8454.
- Geuting V., Kobbe D., Hartung F., Dürr J., Focke M., Puchta H. (2009): Two Distinct MUS81-EME1 Complexes from *Arabidopsis* Process Holliday Junctions. *Plant Physiology* 150: 1062–1071.

- Gnyszka A., Jastrzębski Z., Flis S. (2013): DNA Methyltransferase Inhibitors and Their Emerging Role in Epigenetic Therapy of Cancer. *Anticancer Research* 33: 2989–2996.
- Gowher H., Jeltsch A. (2004): Mechanism of inhibition of DNA methyltransferases by cytidine analogs in cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy* 3: 1062–1068.
- Grant J. J., Chini A., Basu D., Loake G. J. (2003): Targeted Activation Tagging of the *Arabidopsis* *NBS-LRR* gene, *ADRI*, Conveys Resistance to Virulent Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 669–680.
- Gu X., Tohme R., Tomlinson B., Sakre N., Hasipek M., Durkin L., Schuerger C., Grabowski D., Zidan A. M., Radivoyevitch T., Hong C., Carraway H., Hamilton B., Sobecks R., Patel B., Jha B. K., Hsi E. D., Maciejewski J., Sauntharajah Y. (2021): Decitabine- and 5-azacytidine resistance emerges from adaptive responses of the pyrimidine metabolism network. *Leukemia* 35: 1023–1036.
- Hacker L., Dorn A., Enderle J., Puchta H. (2022): The repair of topoisomerase 2 cleavage complexes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 34: 287–301.
- Hartung F., Suer S., Bergmann T., Puchta H. (2006): The role of *AtMUS81* in DNA repair and its genetic interaction with the helicase *AtRecQ4A*. *Nucleic Acids Research* 34: 4438–4448.
- Ho D. T., Sauve D. M., Roberge M. (1994): Detection and Isolation of DNA-Binding Proteins Using Single-Pulse Ultraviolet Laser Crosslinking. *Analytical Biochemistry* 218: 248–254.
- Hoeijmakers J. H. J. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366–374.
- Horton J. K., Stefanick D. F., Prasad R., Gassman N. R., Kedar P. S., Wilson S. H. (2014): Base excision repair defects invoke hypersensitivity to PARP inhibition. *Molecular Cancer Research* 12: 1128–1139.
- Hossain M. A., Lin Y., Yan S. (2018): Single-Strand Break End Resection in Genome Integrity: Mechanism and Regulation by APE2. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 2389.
- Champion C., Guianvarc'h D., Sénamaud-Beaufort C., Jurkowska R. Z., Jeltsch A., Ponger L., Arimondo P. B., Guieysse-Peugeot A. L. (2010): Mechanistic Insights on the Inhibition of C5 DNA Methyltransferases by Zebularine. *PLoS One* 5: e12388.
- Chan K., Resnick M. A., Gordenin D. A. (2013): The choice of nucleotide inserted opposite abasic sites formed within chromosomal DNA reveals the polymerase activities participating in translesion DNA synthesis. *DNA Repair (Amst)* 12: 1–26.
- Chatterjee N., Walker G. C. (2017): Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis* 58: 235–263.
- Chen K. L., Xu M. X., Li G. Y., Liang H., Xia Z. L., Liu X., Zhang J. S., Zhang A. M., Wang D. W. (2006): Identification of *AtENT3* as the main transporter for uridine uptake in *Arabidopsis* roots. *Cell Research* 16: 377–388.

- Cheng J. C., Matsen C. B., Gonzales F. A., Ye W., Greer S., Marquez V. E., Jones P. A., Selker E. U. (2003): Inhibition of DNA Methylation and Reactivation of Silenced Genes by Zebularine. *Journal of the National Cancer Institute* 95: 399–409.
- Chválová K., Brabec V., Kašpárková J. (2007): Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. *Nucleic Acids Research* 35: 1812–1821.
- Ide H., Nakano T., Salem A. M. H., Shoukamy M. I. (2018): DNA-protein cross-links: Formidable challenges to maintaining genome integrity. *DNA Repair* 71: 190–197.
- Ide H., Shoukamy M. I., Nakano T., Miyamoto-Matsubara M., Salem A. M. H. (2011): Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks. *Mutation Research* 711: 113–122.
- Krämer U. (2015): Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* 4:e06100, doi: 10.7554/eLife.06100.
- Kruska K. (2017): Forward genetic screen to identify genes involved in repair of zebularine induced DNA damage. Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung.
- Kuzminov A. (2001): Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 8241–8246.
- Li G., Liu K., Baldwin S. A., Wang D. (2003): Equilibrative Nucleoside Transporters of *Arabidopsis thaliana* – cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 35732–35742.
- Lindahl T., Nyberg B. (1972): Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry* 11: 3610–3618.
- Liu C. H., Finke A., Díaz M., Rozhon W., Poppenberger B., Baubec T., Pecinka A. (2015): Repair of DNA Damage Induced by the Cytidine Analog Zebularine Requires ATR and ATM in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27: 1788–1800.
- Liu C., Pouliot J. J., Nash H. A. (2002): Repair of topoisomerase I covalent complexes in the absence of the tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 14970–14975.
- Lu K., Ye W., Zhou L., Collins L. B., Chen X., Gold A., Ball L. M., Swenberg J. A. (2010): Structural Characterization of Formaldehyde-induced Cross-links Between Amino Acids and Deoxynucleosides and Their Oligomers. *Journal of the American Chemical Society* 132: 3388–3399.
- Mannuss A., Dukowic-Schulze S., Suer S., Hartung F., Pacher M., Puchta H. (2010): RAD5A, RECQ4A, and MUS81 Have Specific Functions in Homologous Recombination and Define Different Pathways of DNA Repair in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 22: 3318–3330.
- Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D., Koornneef M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282: 662–682.

- Murai J., Huang S. Y. N., Das B. B., Renaud A., Zhang Y., Doroshow J. H., Ji J., Takeda S., Pommier Y. (2012): Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Research* 72: 5588–5599.
- Nakamura J., Swenberg J. A. (1999): Endogenous Apurinic/Apyrimidinic Sites in Genomic DNA of Mammalian Tissues. *Cancer Research* 59: 2522–2526.
- Nakano T., Miyamoto-Matsubara M., Shoulkamy M. I., Salem A. M. H., Pack S. P., Ishimi Y., Ide H. (2013): Translocation and Stability of Replicative DNA Helicases upon Encountering DNA-Protein Cross-links. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 4649–4658.
- Nakano T., Xu X., Salem A. M. H., Shoulkamy M. I., Ide H. (2017): Radiation-induced DNA-protein cross-links: Mechanisms and biological significance. *Free Radical Biology and Medicine* 107: 136–145.
- 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., 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: 68–84.
- Pommier Y., Huang S. Y. N., Gao R., Das B. B., Murai J., Marchand C. (2014): Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair* 19: 114–129.
- Pommier Y., Marchand C. (2011): Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes. *Nature reviews. Drug discovery* 11: 25–36.
- Prasad R., Horton J. K., Dai D. P., Wilson S. H. (2019): Repair pathway for PARP-1 DNA-protein crosslinks. *DNA Repair* 73: 71–77.
- Prasad R., Horton J. K., Chastain P. D. II., Gassman N. R., Freudenthal B. D., Hou E. W., Wilson S. H. (2014): Suicidal cross-linking of PARP-1 to AP site intermediates in cells undergoing base excision repair. *Nucleic Acids Research* 42: 6337–6351.
- Prochazkova K., Finke A., Dvořák Tomašítková E., Filo J., Bente H., Dvořák P., Ovečka M., Šamaj J., Pecinka A. (2022): Zebularine induces enzymatic DNA-protein crosslinks in 45S rDNA heterochromatin of *Arabidopsis* nuclei. *Nucleic Acids Research* 50: 244–258.
- Quiñones J. L., Thapar U., Yu K., Fang Q., Sobol R. W., Demple B. (2015): Enzyme mechanism-based, oxidative DNA-protein cross-links formed with DNA polymerase β in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 8602–8607.
- Reardon J. T., Cheng Y., Sancar A. (2006): Repair of DNA-Protein Cross-links in Mammalian Cells. *Cell Cycle* 5: 1366–1370.
- RStudio Team (2020): RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Santi D. V., Garrett C. E., Barr P. J. (1983): On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell* 33: 9–10.

- Schellenberg M. J., Lieberman J. A., Herrero-Ruiz A., Butler L. R., Williams J. G., Muñoz-Cabello A. M., Mueller G. A., London R. E., Cortés-Ledesma F., Williams R. S. (2017): ZATT (ZNF451)-mediated resolution of topoisomerase 2 DNA-protein cross-links. *Science* 357: 1412–1416.
- Stingele J., Bellelli R., Alte F., Hewitt G., Sarek G., Maslen S. L., Tsutakawa S. E., Borg A., Kjær S., Tainer J. A., Skehel J. M., Groll M., Boulton S. J. (2016): Mechanism and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair by the DNA-Dependent Metalloprotease SPRTN. *Molecular Cell* 64: 688–703.
- Stingele J., Habermann B., Jentsch S. (2015): DNA-protein crosslink repair: proteases as DNA repair enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 40: 67–71.
- Stingele J., Schwarz M. S., Bloemeke N., Wolf P. G., Jentsch S. (2014): A DNA-Dependent Protease Involved in DNA-Protein Crosslink Repair. *Cell* 158: 327–338.
- Stresemann C., Lyko F. (2008): Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International Journal of Cancer* 123: 8–13.
- Swenberg J. A., Lu K., Moeller B. C., Gao L., Upton P. B., Nakamura J., Starr T. B. (2011): Endogenous versus Exogenous DNA Adducts: Their Role in Carcinogenesis, Epidemiology, and Risk Assessment. *Toxicological Sciences* 120: 130–145.
- Štěpánek J. (1992): *Arabidopsis* Heynh. – huseníček. In: Hejný S., Slavík B. (eds.): Květena České republiky 3, pp. 115–116, Academia, Praha.
- Talebi A. B., Talebi A. B., Shahrokhifar B. (2012): Ethyl Methane Sulphonate (EMS) Induced Mutagenesis in Malaysian Rice (cv. MR219) for Lethal Dose Determination. *American Journal of Plant Sciences* 3: 1661–1665.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815.
- Wang J. C. (1996): DNA Topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry* 65: 635–692.
- Watanabe K., Pacher M., Dukowic S., Schubert V., Puchta H., 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: 2688–2699.
- Yan S., Wang W., Marqués J., Mohan R., Saleh A., Durrant W. E., Song J., Dong X. (2013): Salicylic Acid Activates DNA Damage Responses to Potentiate Plant Immunity. *Molecular Cell* 52: 602–610.
- Yang X., Lay F., Han H., Jones P. A. (2010): Targeting DNA Methylation for Epigenetic Therapy. *Trends in pharmacological sciences* 31: 536–546.
- Zagnoli-Vieira G., Caldecott K. W. (2017): TDP2, TOP2, and SUMO: what is ZATT about? *Cell Research* 27: 1405–1406.

- Zeng Z., Cortés-Ledesma F., El Khamisy S. F., Caldecott K. W. (2011): TDP2/TTRAP Is the Major 5'-Tyrosyl DNA Phosphodiesterase Activity in Vertebrate Cells and Is Critical for Cellular Resistance to Topoisomerase II-induced DNA Damage. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 403–409.
- Zhang H., Xiong Y., Chen J. (2020): DNA-protein cross-link repair: what do we know now? *Cell & Bioscience* 10: 1–10.
- Zhou L., Cheng X., Connolly B. A., Dickman M. J., Hurd P. J., Hornby D. P. (2002): Zebularine: A Novel DNA Methylation Inhibitor that Forms a Covalent Complex with DNA Methyltransferases. *Journal of Molecular Biology* 321: 591–599.