

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalárska práca

Olomouc 2020

Jaroslav Fiřo

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vývoj systému pro *in vivo* analýzu dynamiky a oprav
toxických DNA-proteinových vazeb u huseníčku
rolního**

Bakalárska práca

Jaroslav Fil'o

Študijný program: Biologie

Študijný odbor: Molekulární a buněčná biologie

Forma štúdia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedúci práce: doc. Mgr. Aleš Pečinka Ph.D

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora: Jaroslav Fil'o

Názov práce: Vývoj systému pro *in vivo* analýzu dynamiky a oprav toxických DNA-proteinových vazeb u huseníčku rolního

Typ práce: bakalárska

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

Vedúci práce: doc. Mgr. Aleš Pečinka Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Kľúčové slová: DNA-proteínová väzba, zebularín, SMC5/6 komplex, konfokálna mikroskopia s rotujúcim diskom

Počet strán: 65

Počet príloh: 0

Jazyk: slovenský

Súhrn:

Porozumenie procesom zodpovedných za vznik určitého typu poškodenia DNA predstavuje dôležitý krok pre možnosť štúdia reparačných mechanizmov, ktoré toto poškodenie opravujú. Jedným z obzvlášť toxických poškodení je DNA-proteínová väzba. Toto poškodenie je charakteristické vznikom stabilnej väzby medzi DNA a proteínom. Takýmto proteínom môže byť akýkoľvek proteín v blízkosti DNA, napríklad: histónové proteíny alebo enzýmy.

Hlavným cieľom tejto bakalárskej práce bolo vytvorenie rastlinných systémov, pomocou ktorých bolo možné vizualizovať vplyv cytidínového analógu zebularínu na tvorbu DNA-proteínovej väzby. Navrhnutie týchto rastlinných systémov sa opieralo o výsledky prác, kde autori študovali efekt zebularínu a iných cytidínových analógov na rastlinné alebo živočíšne systémy. V jednej z takých prác autori preukázali, že zebularín ovplyvňuje DNA METYLTRANSFERÁZU 1 a indukuje tak vznik DNA-proteínovej väzby. Tento efekt zebularínu bol v navrhnutých systémoch, ktoré obsahovali DNA METYLTRANSFERÁZU 1 fúzanú s červeným fluorescenčným proteínom, vizualizovaný metódou konfokálnej mikroskopie s rotujúcim diskom. Po úspešnej vizualizácii efektu zebularínu bol otestovaný jeho vplyv na tvorbu pozorovaného efektu u deficientného mutanta v géne ŠTRUKTÚRNEJ ÚDRŽBY CHROMOZÓMOV 6B. Kvantifikáciou a štatistickým vyhodnotením získaných dát sa podarilo preukázať špecifický efekt zebularínu na pripravené reportérové, kombinované a mutantné línie *Arabidopsis thaliana*. Mutácia v géne ŠTRUKTÚRNEJ ÚDRŽBY CHROMOZÓMOV 6B vedie k zmene dynamiky pozorovaného efektu po vystavení zebularínu.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Jaroslav Filo

Title: Development of an *in vivo* system for analysis of dynamics and repair of toxic DNA-protein crosslinks in *Arabidopsis thaliana*

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, FS UP in Olomouc

Supervisor: Assoc. prof. Ales Pecinka

The year of presentation: 2020

Keywords: DNA-protein crosslink, zebularine, SMC5/6 complex, spinning-disk confocal microscopy

Number of pages: 65

Number of appendices: 0

Language: Slovak

Summary:

Understanding of the processes responsible for certain types of DNA damage is an important step in the process of studying the repair mechanisms that repair this damage. One of the particularly toxic damages is DNA-protein crosslink. This damage is characterized by the formation of a stable bond between DNA and protein. Such a protein can be any protein in the vicinity of DNA, for example histone proteins or enzymes.

The main goal of this bachelor thesis was to create plant systems that could be used to visualize the effect of the cytidine analog zebularin on the formation of DNA-protein crosslink. The design of these plant systems was based on the results of works, where the authors studied the effect of zebularin and other cytidine analogues on plant or animal systems. In one such work, the authors demonstrated that zebularin affects DNA METHYLTRANSFERASE 1 and thus induces the formation of DNA-protein crosslink. This effect of zebularin was visualized by spinning-disk confocal microscopy in the proposed systems, which contained METHYLTRANSFERASE 1 DNA fused to a red fluorescent protein. After successful visualization of the effect of zebularine, its effect on the formation of the observed effect in a deficient mutant in the STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME 6B was tested. By quantification and statistical evaluation of the obtained data, we were able to demonstrate the specific effect of zebularine on the prepared reporter, combined and mutant *Arabidopsis thaliana* lines. A mutation in the STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME 6B gene leads to a change in the dynamics of the observed effect after zebularin treatment.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracoval samostatne s použitím uvedených literárnych zdrojov a pod vedením doc. Mgr. Aleša Pečinku, Ph.D.

V Olomouci dňa:

.....

Fiľo Jaroslav

Pod'akovanie

Rád by som poďakoval svojmu školiteľovi doc. Mgr. Alešovi Pečinkovi Ph.D. a Mgr. Kláre Procházkovej za ich venovaný čas, ochotu, trpezlivosť a odborné vedenie pri vypracovaní bakalárskej práce. Ďalej by som rád poďakoval prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi DrSc. za umožnenie vykonania mikroskopickkej analýzy v jeho laboratóriu a prof. Mgr. Miroslavovi Ovečkovi Ph.D. za jeho odborné vedenie a poskytnutie svojich skúseností s mikroskopiou živých systémov. Na záver ďakujem celému vedeckému tímu doc. Pečinku za ochotu a trpezlivosť počas mojej prítomnosti v laboratóriu.

OBSAH

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK.....	viii
ZOZNAM OBRÁZKOV.....	ix
ZOZNAM TABULIEK.....	x
ZOZNAM GRAFOV.....	xi
1 ÚVOD.....	1
2 CIELE PRÁCE.....	2
3 LITERÁRNY PREHĽAD.....	3
3.1 Prehľad reparačných dráh a ich molekulárne ciele.....	3
3.2 DNA–proteínová väzba u rastlín.....	6
3.2.1 Klasifikácia DNA-proteínových väzieb.....	6
3.2.2 Oprava DPC.....	7
3.2.2.1 Endonukleolytické odstránenie DPC.....	8
3.2.2.2 Proteolytická degradácia DPC.....	9
3.2.2.3 Enzymatická hydrolýza DPC.....	10
3.3 Látky indukujúce špecifické poškodenie DNA a enzýmové jedy.....	11
3.3.1 Cytidínové analógy ako induktory DNA-proteínových väzieb?.....	11
3.3.2 Zebularín aktivuje opravné dráhy reagujúce na poškodenie DNA.....	13
3.4 Mikroskopické metódy detekcie proteínov v živých bunkách.....	14
4 MATERIÁL A METÓDY.....	16
4.1 Materiál a pomôcky.....	16
4.1.1 Laboratórne vybavenie.....	16
4.1.2 Použitý software.....	16
4.1.3 Chemikálie.....	17
4.1.4 Enzýmy.....	18
4.1.5 Oligonukleotidy.....	18
4.1.6 Rastlinný materiál.....	19
4.2 Manipulácia s rastlinným materiálom.....	19
4.2.1 Rast materiálu <i>in vitro</i>	19
4.2.2 Sterilizácia a výsev semien <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
4.3 Selekcia rastlinných línií pre analýzu DPC.....	20
4.3.1 Rastlinné línie pre mikroskopickú analýzu.....	20
4.3.2 Rastlinné línie pre analýzu fenotypu deficientných mutantov.....	21
4.3.3 Kríženie <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
4.3.4 Princíp selekcie rastlinných línií po krížení.....	21

4.3.5	Selekcia pomocou mikroskopie	22
4.3.6	Selekcia pomocou PCR genotypizácie	22
4.3.6.1	Izolácia DNA z rastlín <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
4.3.6.1.1	Modifikovaný protokol Edwards (upravené podľa Edwards <i>et al.</i> , 1991):.....	23
4.3.6.1.2	Protokol Dellaporta (upravené podľa Dellaporta <i>et al.</i> , 1983):	23
4.3.6.2	PCR genotypizácia T-DNA inzerčného mutanta <i>smc6b-1</i>	24
4.3.6.3	CAPS marker.....	25
4.4	Mikroskopia živých systémov	26
4.4.1	Príprava rastlinného materiálu	26
4.4.2	Príprava mikroskopického preparátu	27
4.5	Analýza fenotypov mutantov.....	29
4.6	Štatistické spracovanie dát.....	29
5	VÝSLEDKY	30
5.1	Selekcia rastlinných systémov	30
5.1.1	Línia MET1-RFP PCNA-GFP	30
5.1.2	Línia <i>smc6b-1</i> MET1-RFP.....	31
5.1.3	Línia <i>smc6b-1 cmt3</i>	32
5.2	SD konfokálna mikroskopia <i>in vivo</i> systémov	33
5.2.1	Fyziologické kontroly a pozorovaný efekt zebularínu.....	33
5.2.2	Analógy báz AC, DAC a ZEB indukujú tvorbu MET1-RFP <i>foci</i>	34
5.2.3	Mitomycín C a ani bleomycín nespôsobujú tvorbu MET1-RFP <i>foci</i>	36
5.2.4	Mutácia v géne SMC6B vedie k zmene dynamiky tvorby MET1-RFP <i>foci</i>	38
5.2.5	Vplyv zebularínu na lokalizáciu PCNA1-GFP	41
5.2.6	Analýza vplyvu zebularínu na metyltransferázových mutantov	43
6	DISKUSIA	44
6.1	Selekcia rastlinných systémov.....	44
6.2	Mikroskopia <i>in vivo</i> systémov.....	44
6.2.1	Línia MET1-RFP	44
6.2.2	Experimenty s líniou <i>smc6b-1</i> MET1-RFP.....	45
6.2.3	Zebularín indukuje separáciu signálov MET1-RFP a PCNA1-GFP.....	46
6.3	Analýza fenotypu metyltransferázových mutantov	46
7	ZÁVER	47
8	LITERATÚRA.....	48

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

AC – 5-azacytidín

AP – apurínové/apyrimidínové miesto (Apurinic/Apyrimidinic site)

BER – bázová excízna oprava (Base Excision Repair)

BLE – bleomycín

bp – bázové páry

CMT3 – CHROMOMETYLÁZA 3

CPT – kamptotecín (Camptothecin)

DAC – 5-aza-2-deoxycytidín

DDR – DNA reparačná dráha (DNA Damage Response)

Dnmt1/2/3 – DNA Metyltransferáza 1/2/3

DPC – DNA-proteínová väzba (DNA-protein Crosslink)

DSB – dvojreťazcový zlom (Double-strand Break)

ETO – etopozid (Etoposide)

foci – ložisko

HR – homológna rekombinácia

ICL – medzireťazcová väzba (Interstrand Crosslink)

MET1 – DNA METYLTRANSFERÁZA 1

MMC – mitomycín C

NER – nukleotidová excízna oprava (Nucleotide Excision Repair)

NHEJ – spájanie nehomológnych koncov (Non-Homologous End Joining)

PCNA1 – PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN 1

RFP, GFP, YFP – červený, zelený, žltý fluorescenčný proteín (Red, Green, Yellow Fluorescent Protein)

SD –konfokálna mikroskopia s rotujúcim diskom (Spinning-disk Confocal Microscopy)

ROS – reaktívne formy kyslíka (Reactive Oxygen Species)

SMC5/6 – komplex štruktúrnej údržby chromozómu 5/6 (STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME 5/6)

SMC6B – podjednotka 6B komplexu SMC5/6

SSB – jednoreťazcový zlom (Single-strand Break)

UV – ultrafialové svetlo (Ultra Violet Radiation)

WT – divý typ (Wild Type)

ZEB – zebularín

ZRS – Zebularine Resistant SMC6B

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Schematický model základných poškodení DNA a ich príslušné reparačné dráhy.....	3
Obrázok 2: Schematické znázornenie výsledku poškodenia DNA.	4
Obrázok 3: Klasifikácia typov DNA-proteínových väzieb.	6
Obrázok 4: Schéma DPC a enzýmy zamerané na jednotlivé komponenty u rastlín.	8
Obrázok 5: Cytidín a jeho analógy.....	13
Obrázok 6: Analýza efektu zebularínu na úroveň expície génov a fenotyp deficientných mutantov.	13
Obrázok 7: Schéma svetelného lúča v konfokálnom mikroskope s rotujúcim diskom.....	15
Obrázok 8: Pozorované vzory PCNA1-GFP v jadrách <i>A. thaliana</i>	21
Obrázok 9: Princíp selekcie rastlín naprieč generáciami.....	22
Obrázok 10: Očakávané výsledky separácie PCR produktov genotypizácie mutantu <i>smc6b-1</i>	25
Obrázok 11: Očakávané výsledky CAPS testu po štiepení enzýmom <i>MseI</i>	26
Obrázok 12: Schéma prípravy mikroskopického preparátu.	27
Obrázok 13: Schéma perfúzie (pohľad zpredu).....	28
Obrázok 14: Selekcia línie MET1-RFP PCNA1-GFP v F2 generácii.....	30
Obrázok 15: Výsledok PCR genotypizácie T-DNA inzerčného mutantu <i>smc6b-1</i>	31
Obrázok 16: Výsledok CAPS testu po restričnom štiepení enzýmom <i>MseI</i>	32
Obrázok 17: Fyziologické kontroly a sledovaný efekt zebularínu na líniu MET1-RFP.	33
Obrázok 18: Diferencovaná a meristematická zóna koreňa <i>Arabidopsis thaliana</i> , línia exprimujúca MET1-RFP po ošetrení cytidínovými analógmi.....	34
Obrázok 19: Diferencovaná a meristematická zóna koreňa <i>A. thaliana</i> , línia exprimujúca MET1-RFP po ošetrení DDR chemikáliami.....	36
Obrázok 20: Analýza efektu zebularínu na línie MET1-RFP a <i>smc6b-1</i> MET1-RFP. Snímané po dvoch hodinách inkubácie so zebularínom.....	38
Obrázok 21: Analýza efektu zebularínu na línie MET1-RFP a <i>smc6b-1</i> MET1-RFP. Snímané po ôsmich hodinách inkubácie so zebularínom.	39
Obrázok 22: Porovnanie efektu zebularínu na línie MET1-RFP a <i>smc6b-1</i> MET1-RFP po dvoch a ôsmich hodinách inkubácie.	40
Obrázok 23: Efekt zebularínu na líniu MET1-RFP PCNA1-GFP.	41
Obrázok 24: Efekt zebularínu na vzájomnú lokalizáciu MET1-RFP a PCNA1-GFP v jadre po dvoch hodinách inkubácie.	42
Obrázok 25: Fenotypy 10-dňových mutantných línií po ošetrení zebularínom.	43

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Zloženie použitých pufrov a média.	18
Tabuľka 2: Oligonukleotidy použité pre PCR amplifikáciu.....	18
Tabuľka 3: Zoznam použitých rastlinných línií	19
Tabuľka 4: Zoznam chemikálií a ich pracovné koncentrácie použité v jednotlivých experimentoch. .	19
Tabuľka 5: Podmienky rastu v rastovej komore (Percival) a vo fytotrone.	20
Tabuľka 6: Zloženie PCR zmesi pre genotypovanie mutantu <i>smc6b-1</i>	24
Tabuľka 7: Teplotný cyklus PCR.....	24
Tabuľka 8: Zloženie PCR zmesi pre amplifikáciu časti sekvencie CMT3.....	25
Tabuľka 9: Teplotný cyklus PCR.....	25
Tabuľka 10: Zloženie reakčnej zmesi.	26
Tabuľka 11: Jadrá vykazujúce MET-RFP <i>foci</i> po vystavení zebularínu, 5-azacytidínu alebo 5-aza-2-deoxycytidínu.....	35
Tabuľka 12: Jadrá vykazujúce MET-RFP <i>foci</i> po vystavení zebularínu, mitomycínu C alebo bleomycínu.....	37

ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Jadrá s indukovanými MET1-RFP <i>foci</i> po vystavení zebularínu, 5-azacytidínu alebo 5-aza-2-deoxycytidínu.	35
Graf 2: Frekvencia jadier s indukovanými MET1-RFP <i>foci</i> po vystavení zebularínu, mitomycínu C alebo bleomycínu.....	37
Graf 3: Pomer plôch klíčnych listov deficientných metyltransferázových mutantov po ošetrení zebularínom ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).	43

1 ÚVOD

Molekula DNA je neustále pod tlakom environmentálnych, endogénnych a exogénnych faktorov vyvolávajúcich jej poškodenie. Preto ako odpoveď na neustále vznikajúce poškodenia DNA, došlo k evolúcii reparačných mechanizmov opravujúcich tieto poškodenia (Hacker *et al.*, 2020). Porucha alebo utlmenie reparačnej aktivity týchto mechanizmov môže mať fatálne následky pre udržanie integrity a stability genómu (Hoeijmakers, 2001).

Snaha o pochopenie molekulárnych mechanizmov zodpovedných za rozvoj rôznych ľudských syndrómov viedla k charakterizácii veľkého množstva poškodení DNA. Zároveň sa začínali objavovať prvé práce odkrývajúce molekulárne mechanizmy opráv pre jednotlivé formy poškodení. Mechanizmy opráv DNA sú dnes veľmi dobre preskúmané a stále intenzívne študované hlavne u kvasinkových a živočíšnych systémov (zhrnuté v Houtgraaf *et al.*, 2006). Tento záujem vyplýva zo snahy pochopiť molekulárne príčiny vzniku ochorení a preniesť tieto poznatky do humánnej medicíny.

V posledných rokoch dochádza k pomerne intenzívnemu skúmaniu reparačných dráh i u rastlín. Svoj príspevok na tom majú genomické dáta zo sekvenovania organizmov. Získané informácie poukazujú na prítomnosť rastlinných homológnych génov väčšiny charakterizovaných reparačných dráh u živočíchov (Canturk *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2016). Niektoré dráhy zameriavajúce sa na opravu poškodenia DNA *in sensu stricto* sú preskúmané viac než ostatné. Veľmi dobre preskúmanými dráhami sú napr. excízne opravy a opravy pomocou homológnej rekombinácie. Málo preskúmané sú dráhy zamerané na špecifické poškodenia DNA, ktoré priamo interferujú s procesmi replikácie a transkripcie. Takýmto poškodením je napríklad vznik stabilnej väzby medzi DNA a proteínom, tzv. DNA-proteínová väzba. Tento typ poškodenia je vysoko toxický a priamo ohrozuje integritu genómu (Stingele *et al.*, 2017).

Štúdie na kvasinkách a cicavcoch poodkryli zložité procesy stojace za opravou DNA-proteínovej väzby (Stingele *et al.*, 2014, 2015, 2017; Vaz *et al.*, 2017). V kontraste s množstvom prác na kvasinkách a živočíchoch, len málo prác bolo podniknutých na rastlinných systémoch. Preto ostáva mnoho aspektov vzniku alebo opravy DNA-proteínovej väzby neobjasnených (Enderle *et al.*, 2019a). Vedecká skupina doc. Pečsínku prišla na to, že pre opravu tohto typu poškodenia je dôležitý SMC6B, ktorý je súčasťou SMC5/6 komplexu (STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOME 5/6). SMC5/6 je jeden z málo prebádaných typov DNA reparačného mechanizmu u rastlín (Liu *et al.*, 2015; Prochazkova, Finke et Pecinka, nepublikované).

V snahe o príspevok k študovanému problému, sme sa rozhodli vyvinúť *in vivo* systém z rastlinných reportérových línií, ktorý nám umožní študovať vznik špecifickej enzymatickej DNA-proteínovej väzby a jej opravu pomocou konfokálnej mikroskopie. Cieľom našej práce bolo poskytnúť experimentálne dôkazy o špecifickom pôsobení indukčného činidla zebularínu na tvorbu DNA-proteínovej väzby u divého typu a v náväznosti na prebiehajúci výskum, chceme potvrdiť úlohu komplexu štruktúrnej údržby chromozómov SMC5/6 pri oprave DNA-proteínovej väzby.

2 CIELE PRÁCE

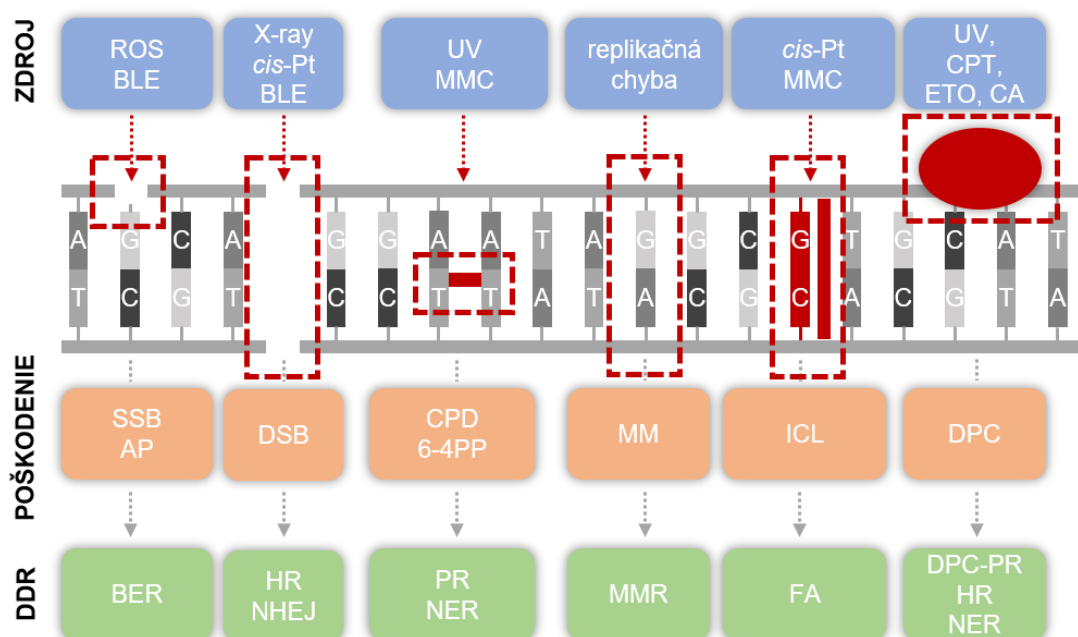
Táto bakalárska práca nadväzuje na poznatky o pôsobení chemickej látky zebularín (Champion *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015; Nowicka *et al.*, 2020). Zebularín je cytidínový analóg dlho používaný ako demetylačné činidlo. Nové práce poukazujú na skutočnosť, že zebularín indukuje špecifické poškodenia DNA, tzv. DNA-proteínovej väzby. Cieľom tejto práce bolo vyvinúť systém umožňujúci analyzovať DNA-proteínové väzby indukované zebularínom pomocou fluorescenčne značeného proteínu, ktorý je naviazaný na DNA a jeho sledovaním pomocou konfokálnej mikroskopie. Pre vypracovanie bakalárskej práce boli za týmto účelom stanovené nasledujúce čiastkové ciele:

1. Vypracovať literárnu rešerš na tému poškodenia DNA a ich opravy so zameraním na DNA-proteínovú väzbu.
2. Príprava mutantných, reportérových a kombinovaných rastlinných systémov.
3. Mikroskopická analýza vplyvu zebularínu a ďalších DNA poškodzujúcich chemikálií na tvorbu a dynamiku DNA-proteínových väzieb *in vivo*.
4. Analýza vplyvu zebularínu na fenotyp mutantov ovplyvňujúcich tvorbu DNA-proteínovej väzby.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Prehľad reparačných dráh a ich molekulárne ciele

Molekula DNA ako nositeľka genetickej informácie hrá ústrednú rolu v diferenciácii, delení, raste a prežití akéhokoľvek živého organizmu. Prostredie, v ktorom sa DNA nachádza, predstavuje hrozbu pre pentózafosfátovú kostru a dusíkaté bázy. Preto v priebehu evolúcie došlo k vývoju DNA reparačných dráh (DDR, DNA Damage Response), ktoré dokážu opraviť poškodenie DNA a udržať tak stabilitu a integritu genómu, vid' Obr. 1 (Vonarx *et al.*, 1998).

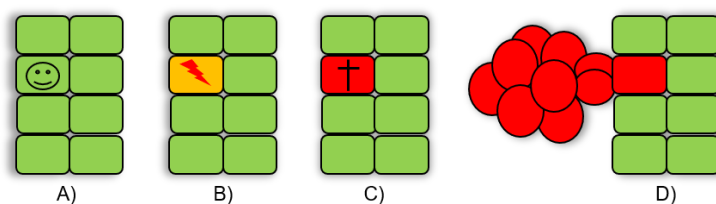


Obrázok 1: Schematický model základných poškodení DNA a ich príslušné reparačné dráhy. Obrázok ďalej ukazuje rôzne laboratórne používané látky alebo typy žiarení, ktoré indukujú určité typy poškodení. ROS – reaktívne formy kyslíka (Reactive Oxygen Species); BLE – bleomycín; X-ray – röntgenové lúče; cis-Pt – cis-platina; UV – ultrafialové žiarenie (Ultra Violet Radiation); MMC – mitomycín C; CPT – kamptotecín (Camptothecin); ETO – etopozid (Etoposide); CA – cytidínové analógy; SSB – jednoreťazcový zlom (Single-strand Break); AP – apurínové/apyrimidínové miesta (Apurinic/Apyrimidinic); DSB – dvojreťazcový zlom (Double-strand Break); CPD – cyklobutánový pyrimidínový dimér; 6-4PP – pyrimidín (6-4) pyrimidón; MM – chybné zaradenie bázy (Mismatch); ICL – medzireťazcová väzba (Interstrand Crosslink); DPC – DNA-proteínová väzba (DNA-Protein Crosslink); DDR – DNA reparačná dráha (DNA Damage Response); BER – bázová excízna oprava (Base Excision Repair); HR – homológna rekombinácia; NHEJ – spojovanie nehomológnych koncov (Non-Homologous End Joining); PR – fotoreaktivácia (Photoreactivation); NER – nukleotidová excízna oprava (Nucleotid Excision Repair); MMR – oprava chybného zaradenia bázy (Mismatch Repair); FA – Fanconiho anémia (Fanconi Anemia); DPC-PR – oprava DPC proteolýzou (DPC-Proteolysis Repair). Obrázok inšpirovaný schémou v publikácii Vaz *et al.*, 2017.

Pre nepohyblivé organizmy ako sú rastliny, predstavujú environmentálne vplyvy výzvu pre ich genetickú informáciu. Typickým environmentálnym faktorom je UV žiarenie (Ultra Violet Radiation), ktoré spôsobuje poškodenie vo forme vnútroreťazcových väzieb (Vonarx *et al.*, 1998). Medzi endogénne zdroje poškodenia DNA patria medziprodukty bunkového metabolizmu. Typickým endogénnym faktorom sú reaktívne formy kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS), ktoré vznikajú napr. oxidatívnou fosforyláciou v mitochondriách. Exogénne faktory spôsobujúce širokú škálu poškodení sú látky využívané v protirakovinovej terapii ale i v základnom výskume. Medzi takéto látky patrí napr. mitomycin C (MMC), bleomycín (BLE), *cis*-platina alebo cytidínové analógy 5-azacytidín (AC) a 5-aza-2-deoxycytidín (DAC).

Vďaka vedeckému záujmu je dnes známa celá škála poškodení DNA. Poškodenia ako zlomy v pentózafosfátovej kostre DNA alebo opravy poškodených nukleotidov sú opravované viacerými reparačnými dráhami, ale často je preferovaná práve jedna dráha. V prípade opráv medzireťazcových väzieb a DNA-proteínových väzieb dochádza k súčinnosti viacerých dráh (Stingele *et al.*, 2017; Enderle *et al.*, 2019b). Výsledky sekvenovania a následná bioinformatická analýza genómu modelového organizmu *Arabidopsis thaliana* odhalili prítomnosť génov, ktoré sú homológne pre veľkú väčšinu reparačných dráh prítomných u ostatných modelových organizmov, vrátane excíznych opráv a homológnej rekombinácie (HR) (Britt, 1995, 1999; Vonarx *et al.*, 1998; Bray *et al.*, 2005; Bleuyard *et al.*, 2006; Kimura *et al.*, 2006).

Všeobecne je možné každú reparačnú dráhu rozdeliť do troch krokov. V prvom kroku dochádza k rozpoznaniu poškodenia. V druhom kroku prejde poškodenie signálnou dráhou a v poslednom kroku dochádza k oprave poškodenia. Bezchybnosť v týchto procesoch je esenciálna pre prežitie organizmu. Pokiaľ dôjde k prerušeniu alebo zastaveniu reparačnej dráhy, môže dôjsť k vzniku mutácie, bunkovej smrti alebo (u živočíchov) k nekontrolovateľnému deleniu, vid' Obr. 2.



Obrázok 2: Schematické znázornenie výsledku poškodenia DNA. A) poškodenie je opravené; B) vznik mutácie; C) bunková smrť; D) nekontrolovateľné bunkové delenie.

Jednou z dobre popísaných reparačných dráh je bázová excízna oprava (Base Excision Repair, BER) zameraná na malé poškodenia báz, ktoré nemajú väčší vplyv na helixovú štruktúru DNA (Krokan *et al.*, 2013). Dusíkatá báza môže byť poškodená pôsobením ROS, spontánnou deamináciou alebo metyláciou DNA prostredníctvom S-adenozylmetionínu (Fortini *et al.*, 2003). Exogénnymi zdrojmi poškodenia môžu byť alkylačné činidlá ako etylmetán sulfonát alebo deaminačné činidlá, napr. kyselina dusitá. Ďalším typom excíznej opravy je nukleotidová excízna oprava (Nucleotide Excision Repair, NER). Cieľom je odstrániť poškodenie DNA, ktoré deformuje štruktúru

α -helixu. Takouto deformáciou môžu byť poškodené nukleotidy alebo DNA-proteínová väzba (DNA-protein Crosslink, DPC) ako následok UV žiarenia (Wood, 1999; Ide *et al.*, 2011, 2018; Manova *et Gruszka*, 2015). Mechanizmus nukleotidovej excíznej opravy u rastlín nebol doposiaľ úplne preštudovaný, zatiaľ čo u cicavcov sú štúdie, ktoré odhaľujú mechanizmus tejto opravy (Vermeulen *et Fousteri*, 2013).

Jedným zo špecifických reparačných mechanizmov pre opravu poškodených nukleotidov u rastlín je fotoreaktivácia. Táto reparačná dráha opravuje poškodenia ako pyrimidínové diméry alebo fotoprodukty indukované UV-B žiarením pomocou enzýmov nazývaných fotolyázy, ktoré rozštiepia atypickú väzbu za použitia energie UV-A žiarenia (Dany *et al.*, 2001).

Ďalším typom reparačnej dráhy je oprava chybného zaradenia báze. Tento reparačný mechanizmus opravuje chyby spôsobené DNA polymerázou počas replikácie. Problém, ktorý predstavuje chybné párovanie báz spočíva v tom, že pokiaľ nedôjde k jeho oprave je táto zmena v ďalšom kole replikácie prevedená na mutáciu. V tom momente je už chyba nedetekovateľná a môže viesť buď k bunkovej smrti alebo k nekontrolovateľnému bunkovému deleniu (Kunz *et al.*, 2009).

Obzvlášť závažným poškodením DNA je vznik dvojreťazcového zlomu (Double-strand Break, DSB). Toto poškodenie je opravované rekombinačnými opravami. Medzi takéto opravy patria dva dobre preskúmané mechanizmy a to spájanie nehomológnych koncov (Non-Homologous End Joining, NHEJ) a homológna rekombinácia. Obidva mechanizmy opravujú dvojreťazcové zlomy, líšia sa však mechanizmom akým túto opravu vykonávajú (Chowdhury *et al.*, 2013).

V prípade opravy mechanizmom NHEJ dochádza k prostému zlepeniu voľných koncov DSB, zatiaľ čo oprava mechanizmom HR využíva na opravu DSB homológny templát, ktorý je prítomný len v S alebo G2 fáze bunkového cyklu (Chowdhury *et al.*, 2013).

Špecifickým typom poškodenia DNA je medzireťazcová väzba (Interstrand Crosslink, ICL). Jej unikátnosť spočíva v tom, že pre jej opravu je nutné zapojenie viacerých reparačných mechanizmov (Moldovan *et D'Andrea*, 2009). Práce na cicavcoch ukázali, že tieto reparačné mechanizmy sú zahrnuté v reparačnej dráhe Fanconioho anémie. ICL vzniká chemickým prepojením dvoch reťazcov DNA (Noll *et al.*, 2006). Faktormi indukujúce vznik ICL sú látky využívané v protirakovinovej terapii, napr. deriváty *cis*-Pt alebo MMC (Iyer *et Szybalski*, 1963). Toxicita tohto typu poškodenia spočíva v zabránení rozchodu reťazcov počas replikácie, čo vedie k zablokovaniu replikačnej vidličky (Vare *et al.*, 2012).

Ďalším poškodením DNA, ktoré taktiež interferuje s replikačným/transkripčným aparátom je DNA-proteínová väzba. Toto poškodenie je dnes predmetom intenzívneho vedeckého bádania. Pretože látky indukujúce vznik DPC predstavujú nový prístup k liečbe určitých typov nádorov. Práve preto mnohé nové poznatky pochádzajú z cicavčích a kvasinkových systémov. Naproti tomu, výskum DPC u rastlín nie je až tak rozvinutý. Bioinformatické dáta predpokladajú prítomnosť rastlinných homológov väčšiny živočíšnych reparačných génov, a teda i tých ktoré by mohli byť zainteresované v oprave DPC. Z tohto dôvodu je oprava DPC u rastlín veľmi aktuálnou témou, čoho dôkazom

je i množstvo publikovaných prác v nedávnej dobe (Stingele *et al.*, 2014, 2015, 2017; Enderle *et al.*, 2019a, 2019b). Tieto práce predstavujú dobrý odrazový mostík pre štúdium tohto typu poškodenia u rastlín.

3.2 DNA–proteínová väzba u rastlín

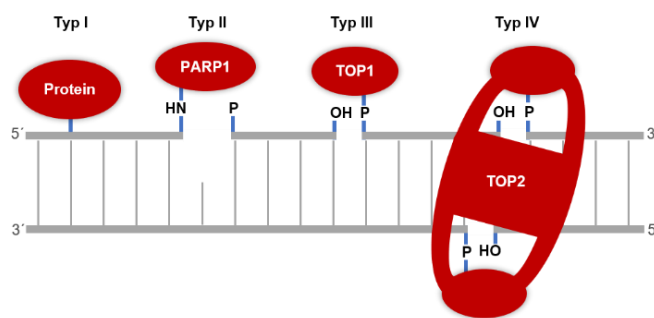
V prípade eukaryotického organizmu prichádza jadrová DNA neustále do kontaktu s obrovským množstvom proteínov, či už histónovej alebo nehistónovej povahy. Príkladom môžu byť proteíny replikačného/transkripčného aparátu alebo proteínové komplexy udržiavajúce stabilitu genómu. Akékoľvek narušenie dynamiky týchto interakcií môže viesť k vážnym biologickým následkom. Vzhľadom na množstvo proteínov, s ktorými prichádza DNA do kontaktu, nie je prekvapením, že môže dôjsť k vytvoreniu špecifického typu poškodenia nazývaného DNA-proteínová väzba (Tretyakova *et al.*, 2015; Stingele *et al.*, 2017). Za normálnej situácie tvorí proteín s DNA dočasnú väzbu. Pokiaľ dôjde k vytvoreniu stabilnej väzby, proteín ostáva zachytený na molekule DNA a môže tak predstavovať stericú bariéru pre ďalšie proteíny.

Narušenie dynamiky interakcie medzi DNA a proteínom, vedúce k vzniku DNA-proteínovej väzby, môže byť spôsobené prítomnosťou iného poškodenia v blízkosti miesta interakcie alebo prítomnosťou exogénneho faktora priamo stojacim za zachytením proteínu na molekule DNA (Hacker *et al.*, 2020).

3.2.1 Klasifikácia DNA-proteínových väzieb

DNA-proteínová väzba je veľmi variabilným typom poškodenia DNA. Základným rozdelením DPC je podľa povahy proteínu, ktorý je zachytený na DNA. DPC rozlišujeme na tzv. enzymatické a neenzymatické (Stingele *et al.*, 2016). Enzymatický DPC vzniká ako následok zachytenia špecifického enzýmu na molekule DNA. Neenzymatický DPC je tvorený ktorýmkoľvek proteínom v blízkosti DNA, napr. históny (Tretyakova *et al.*, 2015).

Ďalším spôsobom akým je možné roztriediť DPC je zohľadnenie faktorov ako je napr. veľkosť proteínu, fyzikálnochemické vlastnosti a povaha samotnej väzby. Podľa týchto faktorov je možné rozlíšiť štyri hlavné typy DPC, vid' Obr. 3 (Hacker *et al.*, 2020).



Obrázok 3: Klasifikácia typov DNA-proteínových väzieb. Jednotlivé typy sú popísané v nasledujúcom texte. PARP1 – Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1; TOP1/2 – TOPoisomerase 1/2. Obrázok inšpirovaný publikáciou Hacker *et al.*, 2020.

Ako typ I sú označené DPC kedy je proteín priamo naviazaný na DNA bez toho, že by došlo k porušeniu reťazcov DNA, vid' Obr. 3. Do tejto skupiny môžeme zaradiť akýkoľvek proteín v blízkosti DNA, ktorý pod vplyvom environmentálnych, endogénnych alebo exogénnych faktorov utvorí s DNA stabilnú väzbu. Exogénnymi faktormi známymi indukciou tohto poškodenia u cicavcov sú cytidínové analógy báz. Ich efekt spočíva v zachytení reakčného medziproduktu DNA metyltransferázy (DNMT) na DNA (Santi *et al.*, 1984).

Typom II je enzymatický DPC, ktorý vzniká v blízkosti apurínového/apyrimidínového (AP) miesta počas BER, vid' Obr. 3. Väzba vzniká medzi DNA a PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1) alebo Pol β (DNA polymerase β) po tom čo došlo k ich stabilizácii na molekule DNA (Ide *et al.*, 2018). Exogénny faktor indukujúci vznik PARP1 DPC je napr. terapeutické liečivo olaparib.

Ako typ III a IV sa označujú DPC tvorené zachytenými štiepnymi komplexami Topoizomeráz 1 (TOP1) alebo TOP2, vid' Obr. 3. Úloha topoizomeráz spočíva v uvoľnení torzného napätia na molekule DNA počas replikácie, rekombinácie alebo transkripcie (Ide *et al.*, 2018). Tieto komplexy môžu byť prevedené na DPC pokiaľ sa v ich blízkosti nachádzajú iné poškodenie DNA, napr. AP miesto alebo jednoreťazcový zlom. Exogénny faktor indukujúci vznik DPC typu III je kamptotecín (Camptothecin, CPT), typ IV je indukovaný etopozidom (ETO). Rozdiel v genotoxicite DPC typu III a IV spočíva v mechanizme akým tieto topoizomerázy fungujú. TOP1 vytvára v DNA jednoreťazcové zárezy, zatiaľ čo TOP2 vytvára DSB. DSB predstavujú obrovské riziko pre udržanie integrity genómu, resp. pre prežitie bunky samotnej. Keďže je funkcia topoizomeráz vysoko konzervovaná naprieč všetkými skupinami organizmov, majú DPC typu III a IV veľký biologický dopad i na genetickú informáciu rastlín (Singh *et al.*, 2004; Hacker *et al.*, 2020).

3.2.2 Oprava DPC

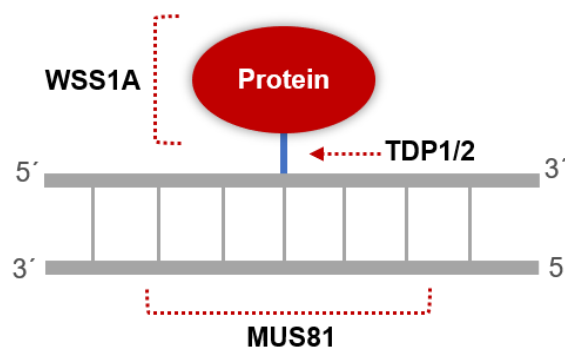
Aktuálne sa predpokladá, že okrem špecifických reparačných dráh sú v oprave DPC zainteresované i klasické reparačné mechanizmy ako NER a HR. Práce na kvasinkách a baktériách potvrdili účasť NER pri oprave menších (<16 kDa) DPC typu I pred vstupom do S fázy bunkového cyklu (Minko *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2007; de Graaf *et al.*, 2009). Veľkosť DPC menšia než 11 kDa u cicavcov je asociovaná s opravou pomocou NER. Tieto zistenia podporujú domnienku, že aby mohol byť veľký DPC opravený pomocou NER musí byť najprv čiastočne zdegradovaný. Vhodným príkladom sú DPC typu III a IV kedy TOP1/2 predstavujú obrovské proteíny, ktoré sú zrejme spracované 26S proteázomom alebo iným špecializovaným enzýmom, napr. TDP1/2 (TYROSYL-DNA PHOSPHODIESTERASE 1/2), pred tým než sa aktivuje NER. Táto hypotéza je zaujímavá, ale stále chýbajú experimentálne dôkazy (Hacker *et al.*, 2020).

Na rozdiel od NER, homologna rekombinácia opravuje menšie, ale i väčšie DPC typu I, III a IV počas S a G2 fázy bunkového cyklu (Nakano *et al.*, 2009; Vaz *et al.*, 2017). Tvrdenie podporujú štúdie mutantných línií u baktérií, húb a cicavcov, ktoré vykazovali zvýšenú senzitivitu voči formaldehydu, AC a ETO (Sabourin *et al.*, 2003; de Graaf *et al.*, 2009; Orta *et al.*, 2013). Zistenia podporujú

aj výsledky štúdie na cicavcoch, kde preukázali zvýšenú frekvenciu reparačných *foci* asociovaných s HR po ošetrení CPT (Ferrara *et al.*, 2004). Je potrebné brať na vedomie, že formaldehyd ako typický induktor DPC typu I, indukuje i tvorbu vnútroreťazcových väzieb a ICL. Teda nie je možné vylúčiť, že zvýšená frekvencia HR nie je následkom inej reparačnej dráhy, napr. dráha Fanconiho anémie (Vaz *et al.*, 2017). S ohľadom na vysokú špecificitu CPT a ETO je možné predpokladať, že homológna rekombinácia je dôležitá pre opravu DPC typu III a IV.

U rastlinných systémov nie je mnoho dôkazov o úlohe týchto klasických reparačných dráh pri oprave DPC. Jedny z mála štúdií naznačujúcich túto skutočnosť boli podniknuté na *A. thaliana*. Po ošetrení zebularínom došlo k zvýšenej expresii okrem iných génov i génov spojených s HR. Ďalším možným argumentom je senzitivita mutantov *atm* (ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED) a *atr* (ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD3-RELATED) po ošetrení zebularínom, čo by mohlo indikovať zahrnutie HR pri oprave poškodenia vyvolaného zebularínom (Liu *et al.*, 2015). Zároveň v tejto štúdií demonštrovali čiastočnú senzitivitu mutantu pre jeden z faktorov NER voči zebularínu, čo naznačuje prítomnosť NER pri oprave DPC (Liu *et al.*, 2015).

V posledných rokoch došlo k charakterizácii troch nových faktorov hrajúcich dôležitú úlohu pri oprave DPC u rastlín. Každý z týchto faktorov cieľi na určitú časť DPC. Jednotlivé ciele DPC môžu byť odstránené buď endonukleolytickým štiepením DNA časti DPC, enzýmom MUS81 (MMS AND UV SENSITIVE 81), degradáciou proteínovej časti DPC proteázou WSS1A (WEAK SUPPRESSOR OF SMT3 PROTEIN) alebo hydrolýzou väzby na rozhraní DNA a proteínu špecializovanými enzýmami TDP1 a TDP2 (TYROSYL-DNA PHOSPHODIESTERASE 1 a 2), vid' Obr. 4 (Hacker *et al.*, 2020).



Obrázok 4: Schéma DPC a enzýmy zamerané na jednotlivé komponenty u rastlín. Schéma inšpirované podľa Stinglee *et al.*, 2017.

3.2.2.1 Endonukleolytické odstránenie DPC

Resolváza MUS81 špecificky cieľi na DNA časť DPC, vid' Obr. 4 (Enderle *et al.*, 2019a). MUS81 patrí do rodiny XPF/MUS81 endonukleáz a je konzervovaná naprieč eukaryotmi (Interthal *et al.*, 2000). Štiepenie špecifických DNA medziproduktov je katalyzované funkčným heterodimérom, ktorý tvorí MUS81 a EME1A (ESSENTIAL MEIOTIC

ENDONUCLEASE 1A, u kvasiniek Eme1) (Boddy *et al.*, 2001; Geuting *et al.*, 2009). Typickým substrátom sú zadržané replikačné vidličky, D-slučky a zárezy pri *Holliday junction* (HJ) (Boddy *et al.*, 2001; Doe *et al.*, 2002; Gaillard *et al.*, 2003; Gaskell *et al.*, 2007; Mannuss *et al.*, 2010). Mechanizmom akým sú tieto štruktúry rozrušené je *nick-couthern* mechanizmus (Gaillard *et al.*, 2003). Bolo dokázané, že MUS81 mutanti vykazovali zvýšenú sensitivitu voči MMC a *cis*-Pt. Toto zistenie viedlo k záveru, že MUS81 je dôležitý faktor pri oprave vnútroreťazcovej väzby a ICL (Mannuss *et al.*, 2010; Enderle *et al.*, 2019b). Obrat nastal po tom čo u ľudských a kvasinkových kultúr deficientných v MUS81 preukázali zvýšenú senzitivitu voči CPT (Liu *et al.*, 2002; Regairaz *et al.*, 2011). Výsledky predošlých štúdií urobili z MUS81 proteín záujmu pri štúdiu DPC u rastlín. Jedným z výsledkov podporujúcich tvrdenie že MUS81 má svoju úlohu i pri oprave DPC, je zvýšená senzitivita mutantov voči *cis*-Pt, ktorá indukuje tvorbu DPC typu I. Aktuálny model opravy pomocou MUS81 nepredpokladá priame vystrihnutie DPC. Zdá sa že MUS81 vytvorí ďalší zárez čo vedie k vzniku DSB. Ten je následne opravený inou reparačnou dráhou, napr. homológnu rekombináciou (Hacker *et al.*, 2020).

3.2.2.2 Proteolytická degradácia DPC

Relatívne nedávno došlo k odhaleniu špecifickej proteázy Wss1 u kvasiniek, ktorá degraduje proteínovú časť DPC. Wss1 je schopná degradovať minimálne DPC typu I, III a IV pričom nie je závislá od zlomov DNA, typu väzby a typu proteínu (Stingele *et al.*, 2014; Serbyn *et al.*, 2020). U živočíchov túto úlohu zastáva proteáza Spartan (SPRTN). Široká špecificita SPRTN/Wss1 rodiny je kontrolovaná viacerými mechanizmami za účelom degradácie len tých proteínov, ktoré sú kovalentne naviazané na DNA. Jedným z takých mechanizmov je tzv. ubiquitínový prepínač. Po proteolyze proteínovej zložky DPC ostáva na DNA zachytený len malý peptid, ktorý je obidený transléziou syntézou DNA (Duxin *et al.*, 2014). Predpokladá sa možnosť odstránenia peptidu i pomocou NER ale tento záver nie je zatiaľ podporený experimentálnymi dátami.

U *Arabidopsis thaliana* bola dokázaná prítomnosť WSS1, ktorý sa tu vyskytuje v dvoch kópiách WSS1A a WSS1B, zatiaľ čo prítomnosť SPRTN nebola potvrdená. Štúdie preukázali významný podiel WSS1A pri reparácii DPC. Štúdia s *knock-out* mutantmi WSS1A odhalila zvýšenú senzitivitu voči *cis*-Pt a CPT (Enderle *et al.*, 2019b). Tieto zistenia potvrdili úlohu WSS1A pri oprave DPC a to konkrétne typu I a III. Ďalšie experimenty s mutantmi *wss1a* poukázali na špecifický fenotyp, kedy bola pozorovaná výrazne redukovaná dĺžka koreňku v porovnaní s divým typom a vyššie množstvo mŕtvych buniek v koreňovom meristeme. Tieto zistenia podporujú význam WSS1A pre bunkové delenie u rastlín (Enderle *et al.*, 2019a, 2019b).

Ďalšou proteázou, ktorá by mohla byť zainteresovaná v oprave DPC u rastlín je DDI1 (DNA DAMAGE INDUCIBLE 1). Pôvodne bolo v práci na kvasinkách potvrdené, že Ddi1 sa chová ako DPC proteáza v prítomnosti Wss1 (Serbyn *et al.*, 2020). Kvasinkový mutanti v géne Ddi1 preukázali vyššiu citlivosť voči *cis*-Pt, CPT a ETO (Stingele *et al.*, 2015; Serbyn *et al.*, 2020). Tieto

výsledky naznačujú že Ddi1 hrá rolu v oprave DPC typu I, III a IV. Zaujímavou informáciou je, že Ddi1 obsahuje RVP doménu (Retroviral Protease), ktorá je v rámci eukaryot vysoko konzervovaná. Je teda možné, že funkcia Ddi1 v oprave DPC je evolučne konzervovaná a prítomná i u rastlín (Hacker *et al.*, 2020).

Jedným z prvých mechanizmov spojených s opravou DPC bola proteolýza 26S proteazómom. Prišlo sa na to po tom, čo boli cicavčie bunky ošetrované inhibítorom proteázomu, čo vyústilo k akumulácii DPC typu III (Desai *et al.*, 1997, 2001). Pôvodne sa predpokladalo, že týmto mechanizmom sú opravované výlučne enzymatické DPC, vzhľadom na polyubiquitináciu pri ich degradácii (Lin *et al.*, 2008; Nakano *et al.*, 2009). Zároveň, ale bolo demonštrované, že proteazóm opravuje i DPC typu II a IV. Výsledky naznačujú, že proteazóm cieľi na rovnaké typy DPC ako Wss1 a SPRTN. Keďže aktívne miesto proteázomu je ukryté v 20S podjednotke, je schopný odstraňovať len veľmi veľké DPC (Larsen *et al.*, 2019). V kontraste s predošlým, SPRTN a Wss1, majú svoje aktívne miesta exponované, čo im umožňuje degradovať proteín až na malý peptidový zvyšok. 26S proteazóm je v rámci eukaryot konzervovaný a jeho funkcia v oprave DPC by mohla byť zrejme tiež konzervovaná v rastlinnej ríši (Hacker *et al.*, 2020). Túto domnienku je nutné podložiť vedeckými dôkazmi, pretože ubiquitin proteazómová signálna dráha je u rastlín zložitejšia než u iných systémov.

3.2.2.3 Enzymatická hydrolýza DPC

Samotná väzba medzi DNA a proteínom je schovaná vo vnútri tohto aduktu a nie je prístupná k hydrolýze (Stingele *et al.*, 2015, 2017). Ďalšou komplikáciou je charakter samotnej väzby, ktorý sa líši v závislosti na aminoreziduách aminokyselín nachádzajúcich sa v jej okolí. Určité enzymatické DPC vznikajú s vyššou frekvenciou a v priebehu evolúcie muselo dôjsť k vzniku enzýmov špecializovaných na reparáciu týchto DPC. Takýmto enzýmom je i TDP1, schopným hydrolyzovať väzbu medzi 3' koncom a aduktom v rámci DPC. Má sa za to, že TDP1 je zapojená v oprave DPC typu II a III (Pommier *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2019). V práci, kde využili myši fibroblast dokázali, že TDP1 je schopná rozrušiť väzbu medzi 3' koncom DNA a primárnou aminoskupinou lyzínu v PARP1, po tom čo PARP1 bolo degradované proteazómom (Prasad *et al.*, 2019). Výrazný pokrok pri odhalení mechanizmu opravy DPC typu III bol publikovaný relatívne nedávno na kvasinkách (Stingele *et al.*, 2014). Tdp1 hydrolyzuje fosfodiesterovú väzbu medzi pentózafosfátovou kostrou DNA a tyrozylovým zvyškom Top1 (Pouliot *et al.*, 1999). Po hydrolýze, ostáva na 3' konci fosfát, ktorý zabraňuje religácii. Tento fosfát je odstránený fosfatázou a vzniknutý jednoreťazcový zlom je následne opravený klasickým BER mechanizmom (Plo *et al.*, 2003).

Štúdie na *A. thaliana* poukazujú na možnú podobnosť vo funkcii TDP1 medzi rastlinami a kvasinkami. Fenotyp a senzitivita *tdp1* mutanta sa neodlišovala od divého typu, ale v kombinácii s mutantom v WSS1A alebo MUS81 došlo k vzniku synergistického efektu. U dvojitéch mutantov došlo k nárastu mŕtvych buniek v koreňovom meristéme a zároveň došlo k zvýšeniu sensitivity voči

CPT. Záverom týchto experimentov bolo, že TDP1 slúži ako záložná reparačná dráha DPC u rastlín (Enderle *et al.*, 2019a). Enzým TDP2 je zodpovedný za hydrolýzu dvoch fosfotyrozylových väzieb medzi Top2 a DNA. Experimenty s deficientnými bunkami v TDP2 ukázali hypersenzitivitu voči ETO a v kombinácii s mutáciou v TDP1, došlo i k aditívnej senzitivite voči CPT (Zeng *et al.*, 2011, 2012). Z uvedeného vyplýva, že TDP2 funguje ako záložná dráha pri hydrolýze väzby u DPC typu III. Samotná hydrolýza väzby je skomplikovaná veľkosťou Top2. Štúdiá na stavovcoch poukázala na to, že TDP2 nie je schopná priamo hydrolyzovať väzbu, z toho dôvodu je v prvom kroku nutná čiastočná hydrolýza proteazómom. V druhom kroku SUMO E3 ligáza ZNT451/ZATT (Zinc finger protein Associated with TDP2 and TOP2) sumoyluje TOP2, čo spôsobí konformačné zmeny proteínu. Vo výsledku dochádza k zmene, ktorá sprístupňuje väzbu k hydrolýze (Schellenberg *et al.*, 2017; Zagnoli-Vieira *et al.* Caldecott, 2017). Po hydrolýze dochádza k vzniku DSB, ktorý je opravený pomocou NHEJ (Gómez-Herreros *et al.*, 2013). Snahy o nájdenie TDP2 u rastlín vyústili v identifikáciu celkovo troch homológov. *A. thaliana* je vlastníkom iba jedného z nich a to TDP2 α (Confalonieri *et al.*, 2014).

3.3 Látky indukujúce špecifické poškodenie DNA a enzýmové jedy

V dnešnej dobe sú látky indukujúce špecifické poškodenie DNA extenzívne využívané v protirakovinovej terapii a zároveň i v základnom výskume. Medzi takéto látky patrí BLE, MMC, CPT a ETO. BLE je rádiomimetické antibiotikum využívané na liečbu rakoviny vaječníkov alebo rakoviny semenníkov. Vo výskume sa využíva kvôli jeho schopnosti indukovať jednoreťazcové a dvojreťazcové zlomy v molekule DNA (Wu *et al.*, 1985). MMC je chemoterapeutikum používané napr. v liečbe rakoviny prsníka. Jeho mechanizmus účinku spočíva v tvorbe vnútroreťazcových a medzireťazcových väzieb v molekule DNA (Iyer *et al.* Szybalski, 1963). CPT a ETO sú enzýmové jedy Topoizoméraz 1 a 2 indukujúce vznik špecifického typu DNA-proteínovej väzby (Liu *et al.*, 1996; Montecuccio *et al.*, 2015).

Ďalšími látkami, ktoré sú charakteristické svojím špecifickým mechanizmom účinku sú cytidínové analógy ako 5-azacytidín, 5-aza-2-deoxycytidín a pravdepodobne i zebularín (Santi *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 2015). Vedecká skupina, v rámci ktorej bola vypracovaná táto bakalárska práca, sa zaoberá zebularínom, ako možným induktorom DNA-proteínovej väzby a pravdepodobnou úlohou SMC5/6 komplexu v oprave tohto poškodenia DNA (Liu *et al.*, 2015; Prochazkova, Finke *et al.* Pecinka, nepublikované).

3.3.1 Cytidínové analógy ako induktory DNA-proteínových väzieb?

Rakovinové bunky sa vyznačujú výraznými výkyvmi úrovne metylácie naprieč genómom. Veľká časť ich genómu je hypometylovaná, ale je možné identifikovať regióny s lokálnym nárastom úrovne metylácie. Tieto regióny sú často hypermetylované promótory tumor supresorových génov, čo vedie k ich umlčaniu (Ehrlich, 2002; Laird, 2005). Analógy cytidínu sú využívané v terapii kvôli svojej schopnosti inhibovať aktivitu DNA metyltransferáz, čo vedie k zníženiu úrovne metylácie.

V rámci eukaryot sú evolučne konzervované tri rodiny DNA metyltransferáz, ktoré sú prítomné u cicavcov tak i u rastlín. Každá rodina sa vyznačuje svojou špecifickou aktivitou. DNA METYLTRANSFERÁZA 1 (MET1) a jej cicavčí homológ (Dnmt1) je zodpovedná za udržiavanie metylácie v motíve CG. Metyltransferázy z ďalšej rodiny sa vyznačujú tRNA metylačnou aktivitou (podobne ako u cicavcov Dnmt2) (Goll *et al.*, 2006). Poslednou rodinou sú *de novo* DNA metyltransferázy kam patrí rastlinná DOMAIN REARRANGED METHYLTRANSFERASE (DRM) a jej cicavčí homológ Dnmt3.

Jedinečná skupina cytozín metyltransferáz prítomná u rastlín sa vyznačuje prítomnosťou chromodomény. CHROMOMETYLÁZA 2 (CMT2) hrá dôležitú úlohu pri udržiavaní CHH motívu (pričom H je C, A alebo T) v špecifickom genomickom kontexte, napr. centrálny región veľkých transponovateľných elementov. CHROMOMETYLÁZA 3 (CMT3) je asociovaná s replikáciou DNA a je kľúčová pre CHG metyláciu (Bartee *et al.*, 2001).

Mechanizmus akým cytidínové analógy, napr. AC alebo DAC inhibujú aktivitu DNA metyltransferáz je dobre preštudovaný na cicavčích systémoch. Po inkorporácii DAC do nového vlákna DNA dochádza k zachyteniu reakčného medziproduktu DNA metyltransferázy na molekule DNA (Santi *et al.*, 1984). Ďalším cytidínovým analógom, ktorý vykazuje podobnú aktivitu ako AC a DAC je zebularín.

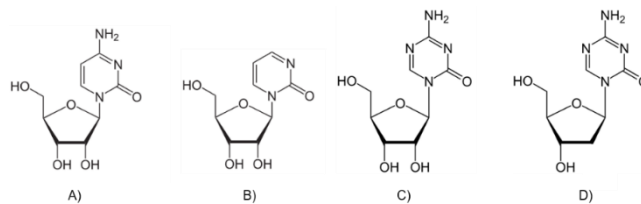
Zebularín je aktuálne predmetom klinických skúšok kvôli jeho potenciálnej tumor supresívnej aktivite. Jedným z dôvodov je fakt, že vykazuje podobný efekt na rakovinové bunky ako DAC, ktorý je schválený pre protirakovinovú terapiu. Zebularín, na rozdiel od predošlých diskutovaných cytidínových analógov, vykazuje vyššiu stabilitu vo vodnom roztoku a menšiu cytotoxicitu (McCarthy *et Rissman*, 2015). Z tohto dôvodu sa javí ako možná alternatíva k DAC.

V *in vitro* podmienkach bolo preukázané, že zebularín dokáže zachytiť bakteriálnu DNA metyltransferázu M.SssI (DNA methylase from *Spiroplasma* sp. strain MQ1) na syntetickom oligonukleotide, ktorý obsahoval zebularín (Champion *et al.*, 2010). Na základe podobných vlastností prokaryotickej M.SssI a cicavčej Dnmt1 je možné predpokladať, že by zebularín mohol špecificky inhibovať Dnmt1 mechanizmom formovania DPC. Táto hypotéza by mohla byť podporená faktom, že rakovinové bunky, ktoré boli vystavené efektu zebularínu v horizonte niekoľkých dní vykazovali vyčerpanie DNMT enzýmov s výraznou senzitivitou práve Dnmt1 (McCarthy *et Rissman*, 2015). Možným vysvetlením by mohlo byť práve zachytenie DNA metyltransferázy na molekule DNA.

Mikroskopický dôkaz zachytenia Dnmt1 po ošetrení cytidínovým analógom DAC predstavuje dobrý argument v prospech formovania DPC u cicavcov (Schermelleh *et al.*, 2007). Autori sledovali vplyv DAC na lokalizáciu dvoch proteínov spojených s replikáciou DNA. Prvým z nich je PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) fúzovaná s červeným fluorescenčným proteínom (Red Fluorescent Protein, RFP). PCNA funguje ako posuvná svorka pre DNA polymerázu δ , ϵ a ďalšie proteíny, ktoré sú súčasťou replizómu (Leonhardt *et al.*, 1992; Chuang *et al.*, 1997; Easwaran *et al.*, 2004). Druhým študovaným proteínom bola práve Dnmt1, fúzovaná so zeleným fluorescenčným

proteínom (Green Fluorescent Protein, GFP), ktorá je taktiež asociovaná s replikáciou. V kontrolných podmienkach vykazovali tieto proteíny kolokalizáciu fluorescenčných signálov. V priebehu dvoch hodín po ošetrení DAC došlo k progresívnej separácii GFP-Dnmt1 a RFP-PCNA. Tento výsledok indikuje zachytenie Dnmt1 na molekule DNA a zároveň poukazuje na to, že cytidínové analógy neovplyvňujú postup replikačnej vidličky (Schermelleh *et al.*, 2007).

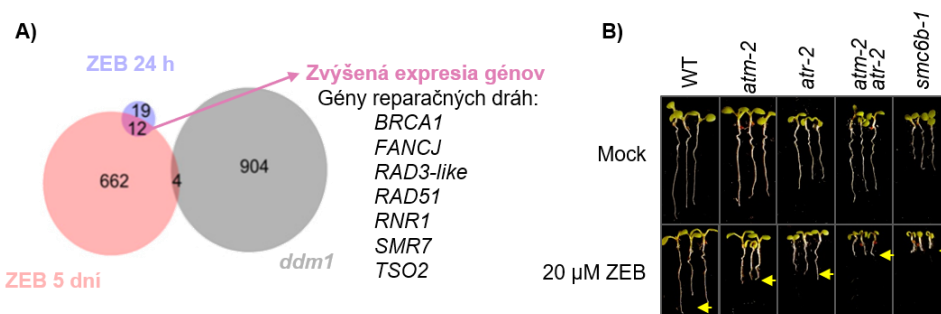
Z doposiaľ uvedených informácií je možné vyvodit' záver, že cytidínové analógy spôsobujú tvorbu enzymatického DPC typu I u cicavcov *in vivo*. Mnohé dôkazy o efekte zebularínu, resp. cytidínových analógov, na indukciu tvorby DPC u rastlín sú zatiaľ nepriame alebo nedostačujúce. Obzvlášť, vplyv zebularínu je aktuálne odhadovaný iba na základe jeho štruktúrnej podobnosti s ostatnými cytidínovými analógmi, vid' Obr. 5.



Obrázok 5: Cytidín a jeho analógy. A) cytidín, B) zebularín, C) 5-azacytidín, D) 5-aza-2-deoxycytidín.

3.3.2 Zebularín aktivuje opravné dráhy reagujúce na poškodenie DNA

Táto práca nadväzuje na publikácie, v ktorých autori študovali vplyv zebularínu a iných cytidínových analógov na rastliny (Baubec *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2019; Nowicka *et al.*, 2020). Pôvodne boli tieto látky charakterizované ako látky čiastočne znižujúce úroveň metylácie DNA, ale v súčasnosti sa hromadia dôkazy, že vyvolávajú špecifické poškodenie DNA. Jeden z dôkazov v prospech poškodzovania DNA zebularínom je zvýšenie expresie génov reparačných dráh po vystavení zebularínu, napr. gény homologúnej rekombinácie alebo Fanconiho anémie, vid' Obr. 6A. Ďalším možným dôkazom je efekt zebularínu na deficientných DNA reparačných mutantov *atm-2*, *atr-2* a mutantu *smc6b-1*, vid' Obr. 6B.



Obrázok 6: Analýza efektu zebularínu na úroveň expresie génov a fenotyp deficientných mutantov. A) Zvýšená expresia génov po ošetrení zebularínom u divého typu. B) Fenotyp mutantov *atm-2*, *atr-2*, *atm-2 atr-2* a *smc6b-1* po vystavení zebularínu. Žlté šípky ukazujú skrátenú dĺžku korenčkov po pôsobení zebularínu. Prevzaté a upravené z Liu *et al.*, 2015.

Citlivosť týchto mutantov voči zebularínu je pravdepodobne daná tým, že zebularín indukuje určité poškodenie DNA (Liu *et al.*, 2015). Hypersenzitivita mutantu *smc6b-1* indikuje, že SMC6B hrá obzvlášť dôležitú úlohu v oprave poškodenia DNA vyvolaného zebularínom (Liu *et al.*, 2015; Prochazkova, Finke et Pecinka, nepublikované).

SMC5/6 komplex, ktorého súčasťou je SMC6B, zastupuje dôležitú úlohu v regulácii rastlinného vývoja, pohlavnom rozmnožovaní, v odpovedi na abiotický stres a pravdepodobne i v oprave poškodenia DNA (Kozak *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015). SMC5/6 komplex patrí medzi komplexy udržiavajúce štruktúru chromozómov. Medzi takéto komplexy patrí, okrem spomenutého SMC5/6, i kohezíny a kondenzíny. Tieto komplexy zastávajú dôležitú úlohu v udržovaní chromozómovej organizácie, dynamiky a ich stability (zhrnuté v Losada *et Hirano*, 2005; Hirano, 2006; De Piccoli *et al.*, 2009; Jeppsson *et al.*, 2014; Uhlmann, 2016).

V náväznosti na predošlé zistenia bol navrhnutý dopredný *ZRS* (*ZEBULARINE RESISTANT SMC6B*) supresorový screen (Prochazkova, Finke et Pecinka, nepublikované). Účelom tohto screenu je identifikácia mutácií, ktoré majú za následok potlačenie hypersenzitívneho fenotypu *smc6b-1* po vystavení zebularínu. Jeden z identifikovaných kandidátov je mutant *met1* v genetickom pozadí *smc6b-1*, čo naznačuje, že zebularín by mohol zachytávať MET1 na molekule DNA. Keďže je MET1 v takomto kandidátovi mutovaná, pravdepodobne nedochádza k jej zachyteniu na molekule DNA a teda ani k tvorbe DPC. Táto skutočnosť viedla k navrhnutiu *in vivo* systémov, ktoré obsahujú MET1 fúzanú s červeným fluorescenčným proteínom (MET1-RFP, Jullien *et al.*, 2012). Domnievame sa, že by bolo možné pomocou takéhoto systému potenciálny DPC vizualizovať.

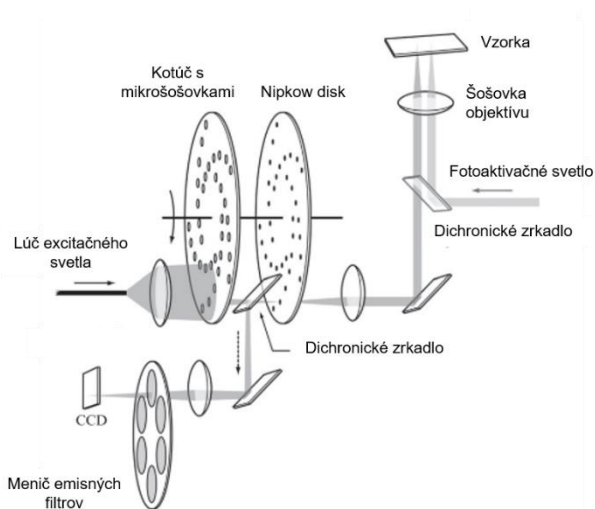
Identifikácia kandidáta *met1* v *ZRS* screene ďalej viedla k otázke, či i iná rastlinná DNA metyltransferáza asociovaná s replikáciou DNA je ovplyvnená zebularínom. Pre otestovanie tejto otázky bola zvolená deficientná DNA metyltransferázová línia *cmt3* (Bartee *et al.*, 2001).

3.4 Mikroskopické metódy detekcie proteínov v živých bunkách

Možnosť presnej vizualizácie proteínov v živých bunkách prišla s objavom GFP technológie (zhrnuté v Remington, 2011) a rozvojom fluorescenčnej mikroskopie. Medzi základné mikroskopické techniky umožňujúce zobrazovať proteíny fúzané s fluorescenčným proteínom patria fluorescenčná mikroskopia a konfokálna mikroskopia. Medzi sofistikovanejšie techniky patrí: konfokálna mikroskopia s rotujúcim diskom (SD), light-sheet konfokálna mikroskopia, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) a FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching).

Pre potreby tejto bakalárskej práce bola zvolená SD konfokálna mikroskopia. Cieľom bolo snímanie intracelulárnej distribúcie fluorescenčných markerov vo vysokom priestorovom a časovom rozlíšení. Metóda SD sa od klasickej konfokálnej mikroskopie líši prítomnosťou rotujúceho disku (Nipkow disk), vid' Obr. 7. Tento disk je charakteristický perforáciami a po jeho ožiarení laserom dochádza k vzniku obrovského množstva lúčov dopadajúcich na vzorku súčasne. Pomocou kamier s výkonnými čipmi je konfokálny obraz zaznamenaný. Obraz je výsledkom mnohých krátkych

expozícií pri nízkej intenzite excitačného žiarenia. Nízkou intenzitou excitačného žiarenia je tak možné predísť vysvieteniu fluorescencie, prípadne poškodeniu preparátu pri dlhodobom snímaní.



Obrázok 7: Schéma svetelného lúča v konfokálnom mikroskope s rotujúcim diskom. Prevzaté a upravené zo Stehens *et al.*, 2012.

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Materiál a pomôcky

V nasledujúcich podkapitolách budú uvedené materiály a pomôcky, použité pri vypracovaní tejto práce.

4.1.1 Laboratórne vybavenie

Pre vypracovanie bakalárskej práce boli použité nasledujúce prístroje:

- automatická pinzeta GentleGrab (Labdeers),
- centrifúga myFuge Mini (Benchmark Scientific),
- elektroforetická komora Wide Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Tech),
- fluorescenčný stereozoom mikroskop SZX12 (Olympus),
- fotoaparát Nikon, AF-S Micro (Nikon),
- fytotronová komora (Wiss Gallenkamp),
- chladená mikrocentrifúga Fresco 17 (Thermo Fisher Scientific),
- laminárny box MSC 1.2 Advantage (Thermo Fisher Scientific),
- laserový mikroskop pre zobrazovanie živých buniek (Spinning-disk, Axio Observer Z1, ZEISS),
- mikrovlnná trúba EMN (Zanussi),
- rastová komora (Percival Scientific),
- stereomikroskop SZX16 (Olympus),
- termoblok Block Heater (Thermo Fisher Scientific),
- termocyklér C1000 Touch (Bio-Rad),
- TissueLyser II (Qiagen),
- transiluminátor InGenius LHR (Syngene),
- zdroj napätia PowerPac™ (Bio-Rad).

4.1.2 Použitý software

Pre vyhodnotenie a spracovanie dát boli využité nasledovné programy:

- ImageJ (verejné vlastníctvo),
- Microsoft Excel (Microsoft),
- Minitab (Minitab Inc.),
- ZEN Blue 2012 (Zen Software Ltd.).

4.1.3 Chemikálie

Pre vypracovanie bakalárskej práce boli použité nasledovné chemikálie. Zloženie pufrov je zhrnuté v Tab. 1.

- 1X TAE pufor,
- 5-aza-2-deoxycytidín (Sigma-Aldrich, kat. č. A3656),
- 5-azacytidín (Sigma-Aldrich, kat. č. A2385),
- 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R0611),
- 96% etanol (Lach-ner, kat. č. 20025-A96),
- agaróza (Amresco, kat. č. 0491B70),
- bleomycín (Sigma-Aldrich, kat. č. B8416),
- BTE pufor,
- deionizovaná voda (H₂O),
- dimetylsulfoxid (DMSO) (Serva, kat. č. 39757),
- EB pufor,
- Edwardsov pufor,
- etídiumbromid (Top-Bio, kat. č. P047),
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM1333),
- chlorid sodný (NaCl) (Lach-ner, kat. č. 30423),
- chlórnan sodný (NaClO) (Sigma-Aldrich, kat. č. 1056142500),
- izopropanol 99% (Lach-ner, kat. č. 20037-AT0),
- kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134),
- kyselina octová (Lach-ner, kat. č. 10047-A99-M1000-1),
- laurylsíran sodný (SDS) (Lach-ner, kat. č. 40089-AP0-G1000-1),
- mitomycin C (Sigma-Aldrich, kat. č. M4287),
- MS mix (Duchefa Biochemie, kat. č. M0231),
- nuclease-free water (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 10977015),
- octan draselný (KAc) (Penta, kat. č. 25017G1000),
- octan sodný (NaAc) (Lach-ner, kat. č. 40122-CP0-G1000-1),
- sacharóza (Lach-ner, kat. č. 10135-AP0),
- tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris) (Sigma-Aldrich, kat. č. T1503),
- Tween20 (Sigma-Aldrich, kat. č. 9005-64-5),
- zebularín (Sigma-Aldrich, kat. č. 3690-10-6),
- β-merkaptóetanol (Sigma-Aldrich, kat. č. M3148).

Tabuľka 1: Zloženie použitých pufrov a médiá.

Pufor	Zložka	Koncentrácia
Edwards pH 7,5–8	Tris	0,2 mol·l ⁻¹
	NaCl	0,25 mol·l ⁻¹
	EDTA	0,025 mol·l ⁻¹
	SDS	0,5 %
	H ₂ O	-
EB pH 8	Tris	0,1 mol·l ⁻¹
	EDTA	0,05 mol·l ⁻¹
	NaCl	0,5 mol·l ⁻¹
	β-merkaptóetanol	10 μmol·l ⁻¹
	H ₂ O	-
BTE pH 7	Tris	0,05 mol·l ⁻¹
	EDTA	0,001 mol·l ⁻¹
	H ₂ O	-
1X TAE pH 8	Tris	0,04 mol·l ⁻¹
	k. octová	0,02 mol·l ⁻¹
	EDTA	0,001 mol·l ⁻¹
½ MS pH 5,8	MS mix	2,2 %
	Sacharóza	1 %
	MES	0,1 %
	Agar	0,6 %

4.1.4 Enzýmy

Pre vypracovanie bakalárskej práce boli použité tieto enzýmy:

- DreamTaq Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific, kat. č. EP1711)
- *MseI* (New England Biolabs, kat. č. R0525S)

4.1.5 Oligonukleotidy

Oligonukleotidy použité pre PCR amplifikáciu sú zhrnuté v tabuľke 2. Všetky oligonukleotidy boli navrhnuté Mgr. Klárou Procházkovou a Mgr. Evou Dvořák Tomašíkovou Ph.D.

Tabuľka 2: Oligonukleotidy použité pre PCR amplifikáciu.

Názov	Sekvencia (5' → 3')
gSMC6B-1_F	AGCTTCAACGTGAAATCATGG
gSMC6B-1_R	CTAGACAACATGTCATACCGGG
T-DNA	ACTGGAACAACACTCAACCCTATCT
gCMT3_F	GTTCTGCGTCAGTTAATTGTTGAG
gCMT3_R	CAGCATGTCAACGACGTTTTCC

4.1.6 Rastlinný materiál

Rastlinné línie použité pri vypracovaní bakalárskej práce sú skladované vo forme semienok, v tme a pri 4 °C. Zoznam línií je zhrnutý v Tab. 3.

Tabuľka 3: Zoznam použitých rastlinných línií

Názov línie	Názov v texte	Zdroj
Col-0	WT	-
<i>ProMET1:MET1-RFP</i>	MET1-RFP	Jullien <i>et al.</i> , 2012
<i>ProPCNA1:PCNA-GFP</i>	PCNA-GFP	Yokoyama <i>et al.</i> , 2016
<i>smc6b-1</i>	<i>smc6b-1</i>	SALK_101968C
<i>cmt3</i>	<i>cmt3</i>	Bartee <i>et al.</i> , 2001
<i>smc6b-1 zrs4-1</i>	<i>smc6b-1 zrs4-1</i>	Prochazkova, Finke et Pecinka, nepublikované
<i>smc6b-1 zrs4-2</i>	<i>smc6b-1 zrs4-2</i>	

4.2 Manipulácia s rastlinným materiálom

4.2.1 Rast materiálu *in vitro*

Pre rast *in vitro* kultúr bolo použité médium Murashige a Skoog (Murashige *et Skoog*, 1962) s polovičnou koncentráciou sacharózy. Zloženie ½ MS je zhrnuté v Tab. 1. Pre potreby jednotlivých experimentov boli testované látky pridané do ½ MS média v požadovanej koncentrácii, viď Tab. 4. Zásobné roztoky boli uchovávané v mraziacom boxe pri -20 °C. Pracovné roztoky boli uchovávané v ľade.

Tabuľka 4: Zoznam chemikálií a ich pracovné koncentrácie použité v jednotlivých experimentoch.

Chemikália	Rozpúšťadlo	Zásobný roztok	Pracovná koncentrácia	Experiment
Kontrola	-	-	-	mikroskopia, selekcia
Zebularín	DMSO	10 mmol·l ⁻¹	10 µmol·l ⁻¹ 40 µmol·l ⁻¹	selekcia
5-azacytidín	H ₂ O	10 mmol·l ⁻¹	40 µmol·l ⁻¹	mikroskopická analýza
5-aza-2-deoxycytidín		10 mmol·l ⁻¹	20 µmol·l ⁻¹	
Mitomycin C		2,25 mmol·l ⁻¹	20 µmol·l ⁻¹	
Bleomycin		100 µmol·l ⁻¹	100 nmol·l ⁻¹	

Podmienky, za ktorých boli rastliny *A. thaliana* pestované sú zhrnuté v Tab. 5. Substrát bol ošetrovaný prípravkom Careo a zmiešaný s perlitom v pomere 3:1. Rastliny použité na genotypizáciu alebo propagáciu rástli vo fytotrone 6–8 týždňov. Po 6–8 týždňoch boli premiestnené do skleníka, kde boli až do konca svojho generačného cyklu. Rastliny určené pre kríženie rástli výlučne vo fytotrone.

Tabuľka 5: Podmienky rastu v rastovej komore (Percival) a vo fytotrone.

Komora	Podmienky (deň/noc)	Účel
Percival	16 hodinový deň, osvetlenie 5:00/21:00, teplota 21 °C/18 °C	<i>in vitro</i> , selekcia
Fytotron	16 hodinový deň, osvetlenie 3:00/19:00, teplota 19 °C/18 °C, vlhkosť 60 %	križenie, propagácia

4.2.2 Sterilizácia a výsev semien *Arabidopsis thaliana*

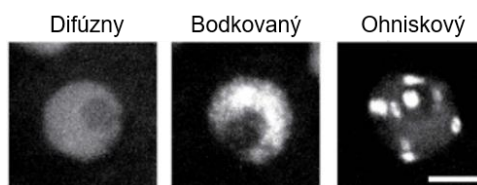
Z dôvodu vyhnutia sa kontaminácie a zaistenia kontrolovateľných *in vitro* podmienok boli všetky semienka sterilizované. Nedodržanie podmienok práce za sterilných podmienok, by mohlo mať negatívny vplyv na výsledok a reprodukovateľnosť experimentu. Potrebné množstvo semienok bolo prenesené do 1,5ml mikroskúmavky. Obsah mikroskúmavky bol premývaný 5 minút (min) v 70% etanole, následne bol etanol odstránený. Nasledovalo 6–10 min premývanie sterilizačným roztokom (8–9% NaClO, 1% Tween 20). Pre dokonalé odstránenie sterilizačného roztoku bolo potrebné semienka 4x premyť sterilnou H₂O. Pred vysievaním boli semienka stratifikované v 0,1% agaróze alebo v tekutom ½ MS po dobu 48 hodín, pri 4 °C a v tme. Semienka boli vysievané na štvorcové petriho misky s tuhým ½ MS médiom (0,6% obsah agarózy) a následne boli umiestnené do rastovej komory Percival.

4.3 Selekcia rastlinných línií pre analýzu DPC

4.3.1 Rastlinné línie pre mikroskopickú analýzu

Pre mikroskopickú analýzu boli použité dominantné reportérové línie MET1-RFP a PCNA1-GFP (PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN 1) značené fluorescenčnými proteínmi. MET1-RFP je komplementovaná línia v *met1-3* mutantnom pozadí pod natívnym promótorom. Línia navyše obsahuje GFP reportér prítomný v semienku (s-GFP). Vzhľadom k tomu, že autori v pôvodnej publikácii preukázali, že MET1-RFP je funkčným konštruktom, nebolo potrebné pri plánovaní experimentov brať do úvahy alelu divého typu. Pomocou s-GFP bolo možné selektovať semienka nesúce MET1-RFP, čo viedlo k významnému urýchleniu selekcie (Jullien *et al.*, 2012). Pomocou tejto línie sme chceli vizualizovať jadrovú lokalizáciu MET1-RFP pred a po inkubácií s testovanými látkami.

Ďalšou použitou líniou bola PCNA1-GFP. Táto línia exprimuje PCNA1 fúzovaný so zeleným fluorescenčným proteínom pod natívnym promótorom (Yokoyama *et al.*, 2016). Pomocou tejto línie sme chceli analyzovať efekt zebularínu na vzájomnú lokalizáciu MET1-RFP a PCNA1-GFP. Táto línia je charakteristická tromi vzormi, ktoré je možné pozorovať v rámci bunkového cyklu. Sú to vzory: „difúzny“, „bodkovaný“ a „ohniskový“, vid' Obr. 8. Vzor „difúzny“ je možné pozorovať v G1 a G2 fáze, vzor „bodkovaný“ na začiatku S fáze a vzor „ohniskový“ v neskoršej S fáze bunkového cyklu (Yokoyama *et al.*, 2016). Pre neskoršie analýzy bolo potrebné nakřížiť tieto dve reportérové línie a vyselektovať dvojité homozygotnú reportérovú líniu MET1-RFP PCNA1-GFP.



Obrázok 8: Pozorované vzory PCNA1-GFP v jadrách *A. thaliana*. Mierka 3 μ m. Prevzaté a upravené z Yokoyama *et al.*, 2016.

Za účelom štúdia lokalizácie MET1-RFP v genetickom pozadí *smc6b-1* boli tieto línie skrížené a následne bola vyselektovaná dvojitá homozygotná línia. Prostredníctvom takéhoto systému sme chceli sledovať zmeny v lokalizácii MET1-RFP po ošetroaní zebularínom v divokom a mutantnom type.

4.3.2 Rastlinné línie pre analýzu fenotypu deficientných mutantov

Pre túto analýzu boli vyselektované homozygotné línie *smc6b-1 zrs4-1*, *smc6b-1 zrs4-2* a *smc6b-1 cmt3*. Prvé dve zmienené línie boli identifikované v ZRS supresorovom skríne (Prochazkova, Finke et Pecinka, nepublikované). Posledná línia tj. *smc6b-1 cmt3* bola pripravená skrížením *smc6b-1* a *cmt3* línií a selekciou dvojitého homozygota v F2 generácii. Účelom tejto línie je poskytnutie informácie, či CMT3 DNA metyltransferáza taktiež vytvára DPC po ošetroaní zebularínom.

4.3.3 Kríženie *Arabidopsis thaliana*

Pre potreby kríženia rastlín *A. thaliana* bolo potrebné odstrániť tyčinky z kvetu, aby nedošlo k samoopeleniu. Pracovalo sa s mladými kvetmi. Tie boli veľmi opatrne otvorené a pinzetou boli odstránené tyčinky. Pri otváraní kvetu je veľmi dôležité aby nedošlo k poškodeniu blizny. Takto vypreparované kvety boli nechané 24 hodín vo fytotrone aby sa zregenerovali. Po uplynutí 24 hodín boli kvety opatrne opäť otvorené a na bliznu bol nanosený peľ z kvetu inej rastliny. Po prenesení peľu bola rastlina vrátená späť do fytotronu. Po troch týždňoch boli pozbierané tobolky z nakrížených kvetov.

4.3.4 Princíp selekcie rastlinných línií po krížení

Cieľom selekcie bolo získať rastliny, ktoré budú homozygotné. V prípade selekcie dvojitej reportérovej línie MET1-RFP PCNA1-GFP bolo cieľom vyselektovať dvojitého dominantného homozygota. Pri selektovaní kombinovanej línie *smc6b-1* MET1-RFP bolo cieľom vyselektovať rastlinu, ktorá bola homozygotným nositeľom mutácie *smc6b-1* a v prípade fluorescenčného markeru, dominantným homozygotom. Cieľom selekcie dvojitej mutantnej línie *smc6b-1 cmt3* bolo vyselektovať homozygotnú rastlinu v obidvoch genotypoch.

Pre navrhnutie experimentu bol využitý Mendelov štvorec, vid' Obr. 9. Pomocou neho bolo možné predpovedať všetky kombinácie genotypov a následne i časovú a technickú náročnosť experimentu. Množstvo rastlín, ktoré mali byť selektované, bolo získané vynásobením maximálneho množstva kombinácií číslom tri, z dôvodu zvýšenia pravdepodobnosti získania požadovanej kombinácie. V prípade selekcie dvoch znakov je maximálny počet kombinácií 16. Na selekciu bolo použitých minimálne 48 rastlín pričom boli očakávané najmenej dve dvojité homozygotné rastliny.

	A) <i>MET1-RFP x PCNA1-GFP</i>					B) <i>smc6b-1 x MET1-RFP</i>					C) <i>smc6b-1 x cmt3</i>																																																													
P:	RRgg		rrGG			ssrr		RRSS			ssCC		SScc																																																											
F1:	RrGg		RrGg			SsRr		SsRr			SsCc		SsCc																																																											
F2:	RG	Rg	rG	rg	SR	Sr	sR	sr	SC	Sc	sC	sc	RG	RRGG	RRGg	RrGG	RrGg	SR	SSRR	SSRr	SsRR	SsRr	SC	SSCC	SSCc	SsCC	SsCc	Rg	RrGg	RRgg	RrGg	Rrgg	Sr	SsRr	SSrr	SsRr	Ssrr	Sc	SsCc	SScc	SsCc	Sscc	rG	RrGG	RrGg	rrGG	rrGg	sR	SsRR	SsRr	ssRR	ssRr	sC	SsCC	SsCc	ssCC	ssCc	rg	RrGg	Rrgg	rrGg	rrgg	sr	SsRr	Ssrr	ssRr	ssrr	sc	SsCc	Sscc	ssCc	sscc
	9 z 16 rastlín pozitívnych na semenkový a koreňový GFP signál					3 z 16 rastlín budú homozygotní mutanti pozitívni na semenkový GFP signál					1 z 16 rastlín bude dvojitý mutant																																																													
F3:	Selekcia rastlín so 100% signálom GFP v semienku a korenku.					Selekcia rastlín so 100% signálom GFP v semienku.					Selekcia nie je potrebná.																																																													

Obrázok 9: Princíp selekcie rastlín naprieč generáciami. A) Selekcija dvojitej reportérovej línie MET1-RFP PCNA1-GFP. B) Selekcija kombinovanej línie *smc6b-1* MET1-RFP. C) Selekcija dvojitej mutantnej línie *smc6b-1 cmt3*. Zvýraznené kombinácie boli v F2 generácii selektované. Legenda: R/G/S/C – dominantná alela; r/g/s/c – recesívna alela; R/r – alely MET1-RFP; G/g – alely PCNA1-GFP; S/s – alely *smc6b-1*; C/c – alely *cmt3*.

4.3.5 Selekcija pomocou mikroskopie

Pomocou fluorescenčnej binokulárnej lupy boli selektované semienka a sedemdnňové koreňové špičky pozitívne na prítomnosť GFP signálu (Jullien *et al.*, 2012; Yokoyama *et al.*, 2016). Rastliny s požadovanými fenotypmi boli, v prípade F1 a F2 generácie, presadené do pôdy a prevedené do ďalšej generácie. V prípade F3 generácie boli vyselektované len rastliny, ktoré vykazovali 100% frekvenciu selektovaného znaku a teda nedochádzalo k segregácii.

4.3.6 Selekcija pomocou PCR genotypizácie

Pomocou tejto metódy boli selektované mutantné rastliny v génoch SMC6B a CMT3. Rastliny *smc6b-1* sú T-DNA inzerčný mutanti, vid' oddiel 4.3.6.2.

Rastliny *cmt3* sú EMS mutagenizovanou líniou, ktorá nesie bodovú mutáciu. Determinovať genotyp rastliny s takouto mutáciou je možné pomocou PCR amplifikácie a následným CAPS testom, vid' oddiel 4.3.6.3.

4.3.6.1 Izolácia DNA z rastlín *Arabidopsis thaliana*

Pre potreby PCR genotypizácie bolo potrebné vyizolovať DNA z rastlinného materiálu. Pri vypracovaní tejto záverečnej práce boli použité dva rôzne protokoly, Edwards – vysokovýkonná upravená metóda (Edwards *et al.*, 1991) a Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983). Edwards sa vyznačuje rýchlosťou a množstvom vyizolovaných vzoriek za čas, ale na úkor čistoty a stability DNA. V ideálnom prípade až 96 vzoriek za 1 h (hodinu). Dellaporta poskytuje väčšie množstvo vyizolovanej DNA, zároveň i čistota (pomer absorbancií 260/280) izolovanej DNA je lepšia. DNA vyizolovaná touto metódou sa môže použiť i na náročnejšie analýzy, napr. Southern blot. Nevýhodou tohto postupu je jeho časová náročnosť.

4.3.6.1.1 Modifikovaný protokol Edwards (upravené podľa Edwards *et al.*, 1991):

Malá časť zeleného listu (veľkosť 0,5 cm) bola spracovaná do mikroskúmavky. Obsah mikroskúmaviek bol pomocou prístroja TissueLyser (Qiagen) zhomogenizovaný (2x 30 sekúnd (s)). Ku vzniknutému prášku bolo pridaných 100 μ l pufru Edwards. Následne bol obsah mikroskúmavky centrifugovaný (2 250 g, 10 min). Do novej mikroskúmavky bolo prenesených 80 μ l supernatantu a pridaných 80 μ l izopropanolu. Následne bol roztok centrifugovaný (2 250 g, 10 min). Supernatant bol odstránený a bolo pridaných 80 μ l 70% etanolu. Následne bol roztok centrifugovaný (2 250 g, 10 min) a supernatant bol odstránený. Precipitát bol vysušený v inkubátore (37 °C, 20 min) alebo pri laboratórnej teplote cez noc. Po vysušení bol precipitát rozpustený v 50 μ l TE pufru. Izolovaná DNA bola skladovaná v chladničke pri teplote 4 °C, maximálne 7 dní.

4.3.6.1.2 Protokol Dellaporta (upravené podľa Dellaporta *et al.*, 1983):

Približne 100 mg materiálu bolo spracovaných do mikroskúmavky a následne do tekutého dusíku (-196 °C). Materiál bol zhomogenizovaný a umiestnený na ľad. Bolo pridaných 500 μ l EB pufru a obsah mikroskúmavky bol premiešaný prevrátením o 180°. Po pridaní 70 μ l 10% SDS bol obsah vortexovaný a potom inkubovaný (65 °C; 10 min). Okamžite po inkubácii bolo pridaných 130 μ l 5mol·l⁻¹ KAc. Mikroskúmavka bola nechaná v ľade 5 min. Vzorka bola centrifugovaná (13 300 g, 10 min). Supernatant bol prenesený do mikroskúmavky obsahujúcej 640 μ l izopropanolu 60 μ l a 3mol·l⁻¹ NaAc. Vzorka bola premiešaná a centrifugovaná (13 300 g, 10 min). Supernatant bol odstránený a precipitát bol premytý 70% etanolom. Po odstránení etanolu a vysušení (37 °C; 20 min) alebo pri laboratórnej teplote cez noc. Precipitát bol rozpustený pridaním 200 μ l BTE pufru (pri laboratórnej teplote cez noc, alebo na 50 °C, 1 hodinu (h)). Vzorka bola centrifugovaná (13 300 g, 10 min). Supernatant bol prenesený do novej mikroskúmavky. K supernatantu boli pridané 2 μ l RNázy A (10 mg·ml⁻¹) a bola prevedená inkubácia (37 °C, 1 h). K vzorke bolo pridaných 20 μ l 3mol·l⁻¹ NaAc a 440 μ l 96% etanolu, následne bola vzorka inkubovaná (-20 °C, 1 h alebo pri laboratórnej teplote cez noc). Vzorka bola centrifugovaná (13 300 g, 10 min). Supernatant bol odstránený a precipitát bol premytý 70% etanolom a následne vysušený. Vzorka bola rozpustená v 20 μ l TE pufru. Izolovaná DNA bola skladovaná pri 4 °C alebo -20 °C.

Vzhľadom na časovú náročnosť protokolu, je možné proces izolácie pre účely PCR genotypizácie ukončiť po rozpustení precipitátu v BTE pufri. Dôvodom prečo bolo prístupné k tomuto protokolu, bola séria neúspešných izolácií pomocou protokolu Edwards.

4.3.6.2 PCR genotypizácia T-DNA inzerčného mutantu *smc6b-1*

T-DNA (transfer DNA) inzerčný mutant je generovaný náhodnou inzerciou T-DNA do genómu v procese transformácie sprostredkovej *Agrobacterium tumefaciens*. Pozícia inzertu je následne zamapovaná v genóme. Dnes sú v prípade *A. thaliana* dostupné mnohé kolekcie/knihovne takýchto T-DNA mutantov. T-DNA inzerčný mutant nachádzajú uplatnenie v tzv. priamej a spätnej genetike za účelom odhalenia molekulárnych mechanizmov biologických procesov u rastlín (Qu et Qin, 2014).

Detekcia inzerčnej mutácie prebieha pomocou vhodnej kombinácie oligonukleotidov forward alebo reverse s T-DNA špecifickým oligonukleotidom. Pri genotypizácii T-DNA inzerčného mutantu je nutné, aby boli pripravené dve sady PCR reakčných zmesí, vid' Tab. 6.

Tabuľka 6: Zloženie PCR zmesi pre genotypovanie mutantu *smc6b-1*. Objem jednej reakcie 20 μ l.

Zásobný roztok	Koncentrácia zásobného roztoku	Pracovná koncentrácia	Objem [μ l]
PCR pufor	10x	1x	2
dNTPs	10 mmol \cdot l ⁻¹	200 μ mol \cdot l ⁻¹	0,4
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase	5 U \cdot μ l ⁻¹	1,25 U/reakcia	0,25
Forward oligonukleotid	10 μ mol \cdot l ⁻¹	0,5 pmol \cdot l ⁻¹	1
Reverse alebo T-DNA oligonukleotid	10 μ mol \cdot l ⁻¹	0,5 pmol \cdot l ⁻¹	1
gDNA	~100 ng \cdot μ l ⁻¹	~50 ng \cdot μ l ⁻¹	1
Nuclease-free H ₂ O	-	-	14,5

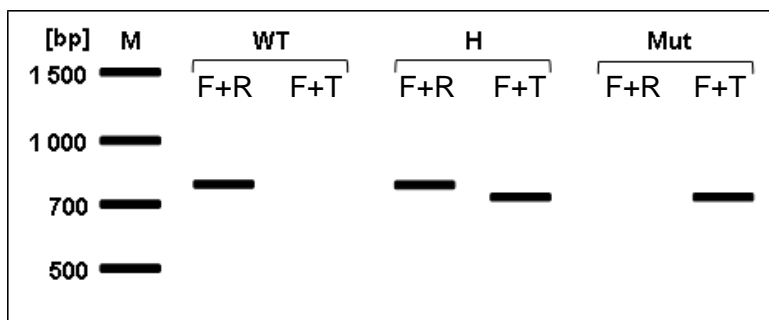
Jedna PCR zmes obsahuje kombináciu oligonukleotidov pre amplifikovanie WT (Wild type, divý typ) alely. Druhá PCR zmes obsahuje kombináciu oligonukleotidov pre amplifikáciu prítomného T-DNA inzertu. Použité oligonukleotidy sú zhrnuté v Tab. 2. Po pripravení PCR zmesi bola vykonaná PCR reakcia, vid' Tab. 7.

Tabuľka 7: Teplotný cyklus PCR.

Proces	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	95	2 min	1
	95	30 s	
PCR amplifikácia	56	30 s	35
	72	60 s	
Záverečná elongácia	72	5 min	1

Pokiaľ došlo k amplifikácii T-DNA inzertu, znamená to, že vzorka bola minimálne heterozygotom. Genotyp sa jednoznačne potvrdí až po získaní informácie, či došlo/nedošlo k amplifikácii alely divého typu. Výsledok PCR amplifikácie bol detegovaný elektroforézou

nukleových kyselín v 1% agarózovom gély. Schematické znázornenie možných výsledkov genotypizácie po elektroforetickej separácii je znázornené na Obr. 10.



Obrázok 10: Očakávané výsledky separácie PCR produktov genotypizácie mutantu *smc6b-1*. Legenda: M – štandard molekulevej hmotnosti; WT – divý typ; H – heterozygot; Mut – mutant; F+R – kombinácia oligonukleotidov amplifikujúca alelu divého typu; F+T – kombinácia oligonukleotidov amplifikujúca mutantnú alelu; F – forward oligonukleotid; R – reverse oligonukleotid; T – T-DNA špecifický oligonukleotid.

4.3.6.3 CAPS marker

Detekcia bodovej mutácie v sekvencii génu CMT3 prebiehala pomocou PCR amplifikácie a následného restriktívneho štiepenia. V prvom kroku bola časť génu CMT3 amplifikovaná pomocou PCR reakcie s využitím špecifických oligonukleotidov, vid' Tab. 2. Zloženie PCR zmesi a nastavenie teplotného cyklu, vid' Tab. 8 a 9.

Tabuľka 8: Zloženie PCR zmesi pre amplifikáciu časti sekvencie CMT3. Objem jednej reakcie 20 μ l.

Látka	Koncentrácia zásobného roztoku	Pracovná koncentrácia	Objem [μ l]
PCR pufor	10x	1x	2
dNTPs	10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,4
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase	5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,25 U/reakcia	0,1
Forward primer gCMT3_F	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,5 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1
Reverse primer gCMT3_R	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,5 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1
gDNA	$\sim 100 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	$\sim 50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1
Nuclease-free H ₂ O	-	-	14,5

Tabuľka 9: Teplotný cyklus PCR.

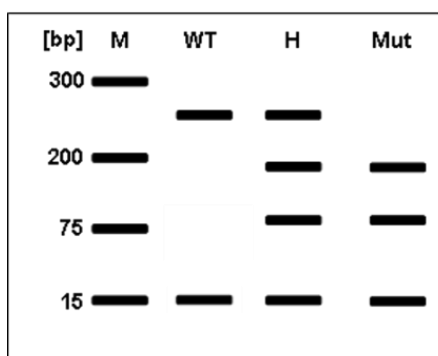
Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklov
Úvodná denaturácia	95	2 min	1
	95	30 s	
PCR amplifikácia	55	30 s	35
	72	60 s	
Záverečná elongácia	72	5 min	1

V ďalšom kroku bol produkt PCR reakcie štiepený pomocou restriktívnej endonukleázy *MseI*. Reakčná zmes bola inkubovaná pri 37 °C po dobu 75 min. Zloženie reakčnej zmesi je zhrnuté v Tab. 10.

Tabuľka 10: Zloženie reakčnej zmesi. Objem jednej reakcie 10 µl.

Látka	Koncentrácia zásobného roztoku	Pracovná koncentrácia	Objem [µl]
Reakčný pufo	10x	1x	2
<i>MseI</i>	10 U·µl ⁻¹	2 U/reakcia	0,2
PCR produkt	-	-	3
Nuclease-free H ₂ O	-	-	5,8

Pokiaľ by sa jednalo o divý typ, fragmenty by mali veľkosť 266 a 15 bp. Pokiaľ by vzorka DNA pochádzala od mutanta, došlo by k štiepeniu na 3 fragmenty o veľkosti 181, 85 a 15 bp. Výsledky štiepenia pre jednotlivé genotypy sú znázornené na Obr. 11. Výsledok restriktívneho štiepenia bol detegovaný pomocou elektroforézy v 1% agarózovom géle. S ohľadom na použitú koncentráciu agarózového gélu, je pravdepodobné že fragment o veľkosti 15 bp nebude možné detekovať.



Obrázok 11: Očakávané výsledky CAPS testu po štiepení enzýmom *MseI*. Legenda: M – štandard molekulevej hmotnosti; WT – divý typ; H – heterozygot; Mut – mutant.

4.4 Mikroskopia živých systémov

4.4.1 Príprava rastlinného materiálu

Príprava rastlinného materiálu je popísaná v oddiele 4.2. Sterilné semenka boli stratifikované v tekutom ½ MS médiu 48 h pri 4 °C. Voľba stratifikácie v tekutom ½ MS médiu bola založená na potrebe jednoduchšej manipulácie so semenkami pri výseve. Semenka boli prenesené z mikroskúmavky na sterilný filtračný papier, kde boli ponechané približne 15 min aby sa vysušili. Po vysušení boli semenka vysievané na povrch tuhého ½ MS média (0,6% agaróza). Samotný výsev na médium bol realizovaný automatickou pinzetou GentleGrab (Labdeers), pinzeta umožňovala veľmi jednoduché a presné manipulovanie so semenkami čo dopomohlo k optimalizácii výsevu. Po vysiatí boli Petriho misky zalepené Parafilmom a umiestnené do rastovej komory kolmo voči podložke

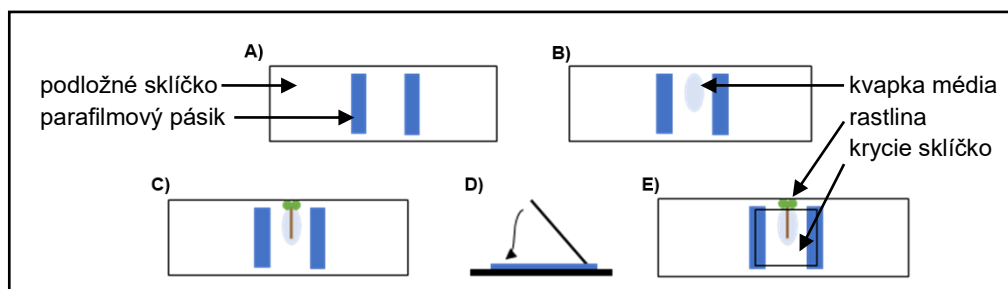
na tri dni. Dôvodom takejto orientácie misky je zabránenie rastu koreňka do vnútra média, čím sa predišlo jeho poškodeniu pri neskoršej príprave mikroskopického preparátu.

4.4.2 Príprava mikroskopického preparátu

Pre potreby mikroskopie je potrebné aby rastlina bola adaptovaná na prostredie v ktorom bude snímaná. Táto príprava bola vykonaná podľa publikovaného protokolu (Ovečka *et al.*, 2005). Adaptáciou rastliny sa predišlo ovplyvneniu bunkového cyklu a rastlina mala optimálne podmienky pre rast. Samotná príprava mikroskopického preparátu prebiehala nasledovne.

Podložné a krycie sklíčka bolo nutné očistiť a odmastiť pomocou saponátu. Následne bolo sklíčko opláchnuté vodou z vodovodu, potom 70% etanolom a nakoniec destilovanou H₂O. Sklíčka boli postavené užšou stranou na filtračný papier a nechali sa vysušiť. Suché podložné a krycie sklíčka boli pomocou pinzety umiestnené do kyvety. Kyveta so sklíčkami bola následne naplnená 96% etanolom a sklíčka boli ponechané v etanole po dobu 20 min. Kyveta bola premiestnená do laminárneho boxu a pomocou pinzety boli podložné a krycie sklíčka vybrané z kyvety a vysušené prúdom vzduchu v laminárnom boxe. Etanol v kyvete bol preliaty do zásobnej fľaše a uchovaný pre neskoršie použitie.

Na suché sterilné podložné sklíčko boli nalepené 2 pásiky Parafilmu (viď obrázok 12A). Vzdialenosť pásov, bola približne 18 mm. Do suchej, sterilnej a odmastenej kyvety bolo naliatych 55 ml tekutého ½ MS média. Do priestoru medzi parafilmové pásiky bolo pomocou automatickej pipety nanosených 10 µl tekutého ½ MS média (viď obrázok 12B). Do tejto kvapky média bola pomocou pinzety prenesená trojdňová rastlina z Petriho misky (viď obrázok 12C). Krycie sklíčko bolo veľmi opatrne položené na pásiky Parafilmu (viď obrázok 12D). Takto pripravený preparát (viď obrázok 12E) bol umiestnený do kyvety s médiom. Po položení sklíčka do kyvety, začalo médium vzlínať do priestoru medzi podložným a krycím sklíčkom. Došlo tak k vytesneniu bublín a dokonalému vyplneniu komôrky médiom. Kyveta bola uzavrená, zalepená Parafilmom a umiestnená do rastovej komory (Percival), kde boli rastliny adaptované 10–12 hodín.



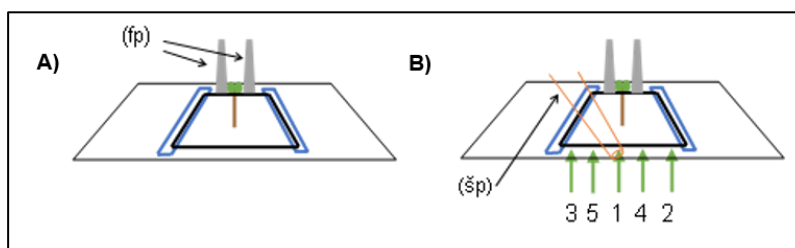
Obrázok 12: Schéma prípravy mikroskopického preparátu. Orientácia: A, B, C, E pohľad zhora; D pohľad zo strany.

Po uplynutí času adaptácie nasledovala perfúzia. Perfúzia je šetrný spôsob ako dostať testovanú látku do blízkosti koreňka, ktorý sa nachádza medzi podložným a krycím sklíčkom. K tomuto úkonu

bolo prístupné z jedného jediného dôvodu a to aby nebolo potrebné otvárať komôrku a predišlo sa tak poškodeniu preparátu.

Ešte pred samotnou perfúziou bolo potrebné pripraviť roztoky testovaných chemikálií. Tieto roztoky bolo nutné pripraviť z média, v ktorom boli rastliny adaptované. Tento krok je nutný k tomu aby sa zachovali podmienky v ktorých bola rastlina adaptovaná a nedošlo k neúmyselnému ovplyvneniu výsledkov. Po pripravení pracovných roztokov testovaných látok bolo prístupné k samotnej perfúzii.

Perfúzia prebiehala nasledovne. K rastlinke boli opatrne priložené dva filtračné papieriky ktoré mali rovnaký rozmer, vid' Obr. 13A. Dôvodom prečo museli mať filtračné papieriky rovnaký rozmer je zaistenie konštantného ubúdania média v komôrke. Po tom, čo došlo k zmočeniu papierika začal objem média v komôrke klesať. Pomocou automatickej pipety bolo do komôrky prenesených 10 μ l roztoku testovanej látky. Poloha aplikácie roztoku testovanej látky bola menená tak, aby sa dosiahlo optimálneho vymytia objemu komôrky, vid' Obr. 13B.



Obrázok 13: Schéma perfúzie (pohľad zpredu). A) dva filtračné papieriky (fp) a ich poloha; B) 1–5 – rôzne polohy pipetovania; šp – špička pipety.

Rýchlosť pipetovania bola približne 10–15 μ l·min⁻¹. Typickým znakom rýchlej aplikácie roztoku bolo oddelenie buniek koreňovej čiapočky. Po aplikácii bol priestor komôrky zalepený Parafilmom tak, aby nedochádzalo k odparovaniu média počas snímania. Takto pripravený preparát bol vložený do vlhkej komôrky na dobu nutnej inkubácie. Po inkubácii bol preparát premiestnený do mikroskopu a snímaný. Parametre snímania boli nasledovné. Detekcia mRFP1.2 (MET1-RFP) s excitáciou 590 nm a v emisnom spektre pri 612 nm. Detekcia EGFP (PCNA1-GFP) s excitáciou pri 488 nm a v emisnom spektre 509 nm. Celkom bolo snímaných približne 70–80 optických rezov zachycujúci epidermis, kortex a endodermis meristematickej a diferencovanej zóny.

Na získané mikroskopické snímky bol aplikovaný počítačový matematický algoritmus, tzv. dekonvolúcia, za účelom vylepšenia nasnímaných signálov. Dekonvolúciou boli získané obrázky, ktoré mali vylepšenú ostrosť, potlačený nešpecifický signál a nižšie pozadie. Takto upravené obrázky bolo jednoduchšie vyhodnotiť, čím sa zvýšila presnosť kvantifikácie.

4.5 Analýza fenotypov mutantov

Sterilizácia a výsev rastlinného materiálu je popísaný v odiele 4.2. Rastliny boli vysiate v dvoch sadách. Kontrolná sada bola rastená na $\frac{1}{2}$ MS médiu bez zebularínu. Druhá sada bola rastená na $\frac{1}{2}$ MS médiu s prídavkom zebularínu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Petriho misky boli umiestnené do rastovej komory (Percival), vodorovne s podložkou, kde boli ponechané 10 dní. Po 10 dňoch boli Petriho misky vyfotografované. Pre meranie veľkosti plochy klíčnych listov bol využitý program ImageJ.

4.6 Štatistické spracovanie dát

Za účelom zistenia variability v získanom súbore dát bola použitá jednosmerná ANOVA analýza. Pre porovnanie jednotlivých testovaných látok v rámci jednotlivých zón koreňa bol použitý Fisherov test s intervalom spoľahlivosti $p = 0,05$. Pre porovnanie efektu zebularínu na deficientných DNA metyltransferázových mutantov bol použitý Tukeyho test s intervalom spoľahlivosti $p = 0,05$.

Pre porovnanie distribúcie kvantitatívneho znaku u dvoch nezávislých línií bol použitý Mann-Whitney-Wilcoxon test s intervalom spoľahlivosti $p = 0,05$. Pre tieto analýzy bol využitý program Minitab.

Za účelom vizualizácie závislosti lokalizácie MET1-RFP a PCNA1-GFP *foci* po ošetrení zebularínom boli využité Vennove diagramy. Na zostrojenie Vennových diagramov bol použitý online nástroj prístupný na adrese <http://eulerr.co/>. Za účelom preukázania signifikantnosti v zmene vzájomnej lokalizácie signálov MET1-RFP a PCNA1-GFP, bol na získané dáta aplikovaný Študentov t-test s intervalom spoľahlivosti $p = 0,05$.

5 VÝSLEDKY

5.1 Selekcia rastlinných systémov

Selekcia hybridov v F1 generácii nebola potrebná vzhľadom na povahu kríženia a vlastnosti jednotlivých línií. Po získaní semienok z jednotlivých krížení boli hybridy prevedené do F2 generácie.

V F2 generácii hybridov dochádzalo k segregácii alel podľa 2. Mendelovho zákona. Postupnou selekciou na prítomnosť/absenciu GFP signálov v semienkach alebo koreňových špičkách a PCR genotypizáciou bola redukovaná veľkosť experimentov. Následkom toho klesala priestorová a časová náročnosť experimentov.

5.1.1 Línia MET1-RFP PCNA1-GFP

Selekcia dvojitej línie MET1-RFP PCNA1-GFP prebiehala pomocou fluorescenčnej mikroskopie. V prvom kroku selekcie boli selektované semienka na prítomnosť s-GFP línie MET1-RFP. Z celkovo analyzovaných 1 799 semienok, bolo 74 % (n = 1 332) semienok pozitívnych na s-GFP. V druhom kroku bolo analyzovaných 188 rastlín, pričom 62 % (n = 116) bolo pozitívnych na GFP v koreňových špičkách (k-GFP), vid' Obr. 14. Získaný pomer bol nižší než sme očakávali, čo môže byť spôsobené letálnosťou recesívnych homozygotov *met1*.

F2	RG	Rg	rG	rg	analyzovaných semienok:	1 799
RG	RRGG	RRGg	RrGG	RrGg	s-GFP pozitívnych:	1 332 (74 %)
Rg	RrGg	RRgg	RrGg	Rrgg		
rG	RrGG	RrGg	rrGG	rrGg		
rg	RrGg	Rrgg	rrGg	rrgg	analyzovaných korieňkov:	188
					k-GFP pozitívnych:	116 (62 %)
					Očakávaný pomer 9 z 16.	
					Získaný pomer 7 z 16.	

Obrázok 14: Selekcia línie MET1-RFP PCNA1-GFP v F2 generácii. Legenda: R/G – dominantná alela; r/g recesívna alela; R/r – alely MET1-RFP; G/g – alely PCNA1-GFP; s-GFP – semienkový GFP signál asociovaný s MET1-RFP; k-GFP – korieňkový PCNA1-GFP signál.

Následne bolo 30 korieňkov, ktoré boli pozitívne na zelenú fluorescenciu v semienku a v koreňovej špičke presadených z média do pôdy. Do ďalšej generácie prešlo 25 rastlín, z ktorých boli získané semienka F3 generácie. Zvyšných päť rastlín uschlo.

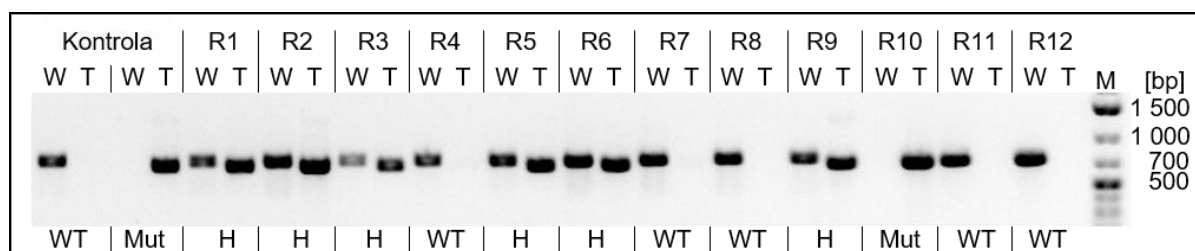
Selekcia v F3 generácii prebiehala nasledovne. V prvom kroku boli selektovaní hybridy, u ktorých mali všetky ich semienka zelenú fluorescenciu. Vyselektovaných bolo 12 hybridov. Následne bolo na ½ MS medium vysiatych približne 40 vyselektovaných semienok od každého hybridu. Všetci hybridy vykazovali segregáciu v PCNA1-GFP. Tento výsledok selekcie nebol v súlade s očakávaním, keďže už v F3 generácii malo byť možné vyselektovať dvojitého homozygota. Preto bolo nutné línie previesť do ďalšej generácie. Do F4 generácie bolo vysiatych 40 semienok hybridu, ktorý mal PCNA1-GFP signál v koreňovej špičke a neselegoval v MET1-RFP. Získané boli semienka z 31 hybridov. Zvyšných deväť rastlín uschlo.

V F4 generácii boli selektovaní hybridy, ktorí nevykazovali segregáciu v selektovaných

znakoch. Všetky semenka analyzovaných rastlín (n = 31) boli pozitívne na s-GFP. Na tuhé ½ MS médium bolo vysiatych približne 40 semienok od každého hybridu. Vyselektovaní boli traja hybridi, ktorí nesegregovali v PCNA1-GFP.

5.1.2 Línia *smc6b-1* MET1-RFP

Pri selekcii línie *smc6b-1* MET1-RFP bola využitá fluorescenčná mikroskopia a PCR genotypizácia. V F2 generácii boli v prvom kroku selekcie selektované semenka so zelenou fluorescenciou. Celkom bolo analyzovaných 668 semienok v rámci ktorých bolo 73 % (n = 668) pozitívnych na s-GFP. V druhom kroku selekcie bolo do pôdy vysiatych 40 vyselektovaných semienok a asi po mesiaci bolo genotypovaných 22 rastlín. Ostatné rastliny s ohľadom na výsledok genotypizácie neboli genotypované. Podarilo sa vyselektovať 12 homozygotných rastlín nesúcich T-DNA inzert v géne *smc6b-1*. Reprezentatívny gél PCR genotypizácie *smc6b-1* mutanta je možné vidieť na obrázku 15. Vyselektované mutantné rastliny boli prevedené do F3 generácie.



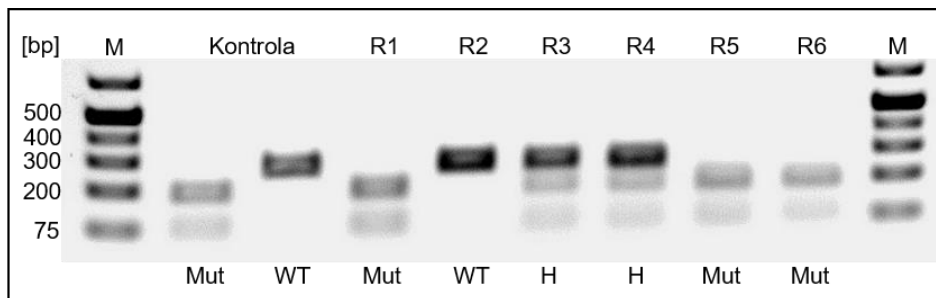
Obrázok 15: Výsledok PCR genotypizácie T-DNA inzerčného mutanta *smc6b-1*. Legenda: W – alela divého typu; T – mutantná alela; R1–R12 – vzorky; WT – divý typ; H – heterozygot; Mut – mutant. M – štandard molekulej hmotnosti.

V F3 generácii boli selektované rastliny, ktoré nevykazovali segregáciu v MET1-RFP. Analyzovaných bolo 12 rastlín. Vyselektované boli tri rastliny, u ktorých nedochádzalo k segregácii MET1-RFP.

Keďže mutanti *smc6b-1* sú hypersenzitívni voči zebularínu (Liu *et al.*, 2015), bolo možné na základe fenotypu overiť genotyp. Na ½ MS médium s prídavkom ZEB (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), bolo vysiatych 30 semienok od každej rastliny a boli nechané v rastovej komore (Percival) 10 dní. Po uplynutí 10 dní boli Petriho misky s narastenými rastlinami vizuálne skontrolované. Kontrola selekcie odhalila segregáciu alely *smc6b-1*. Následne bolo pomocou pinzety, za sterilných podmienok, prenesených 11 hypersenzitívnych rastlín na pevné ½ MS medium (0,6% agaróza). Rastliny boli regenerované 10 dní v rastovej komore. Následne bolo osem rastlín (tri uhynuli) presadených do pôdy a po siedmich dňoch boli tieto rastliny genotypované. Všetky hypersenzitívne rastliny boli podľa PCR genotypizácie homozygotnými nositeľmi alely *smc6b-1*.

5.1.3 LÍNIA *smc6b-1 cmt3*

Pre selekcii línie *smc6b-1 cmt3* bola využitá PCR genotypizácia a CAPS marker. Pomocou PCR genotypizácie bolo genotypovaných 27 rastlín F2 generácie. Podarilo sa vyselektovať päť homozygotných hybridov nesúcich alelu *smc6b-1*. U týchto piatich hybridov, plus jeden heterozygot, bola následne pomocou PCR amplifikovaná časť sekvencie génu CMT3, v ktorej by sa mala nachádzať bodová mutácia (Bartee *et al.*, 2001). Následne boli pomocou restriktčného štiepenia a elektroforetickej separácie vyselektovaní mutanti *cmt3*, vid' Obr. 16. Pruh o veľkosti 15 bp sa nepodarilo zachytiť, keďže bol použitý 1% agarózový gél. Z celkového počtu rastlín, sa podarilo vyselektovať troch mutantov.

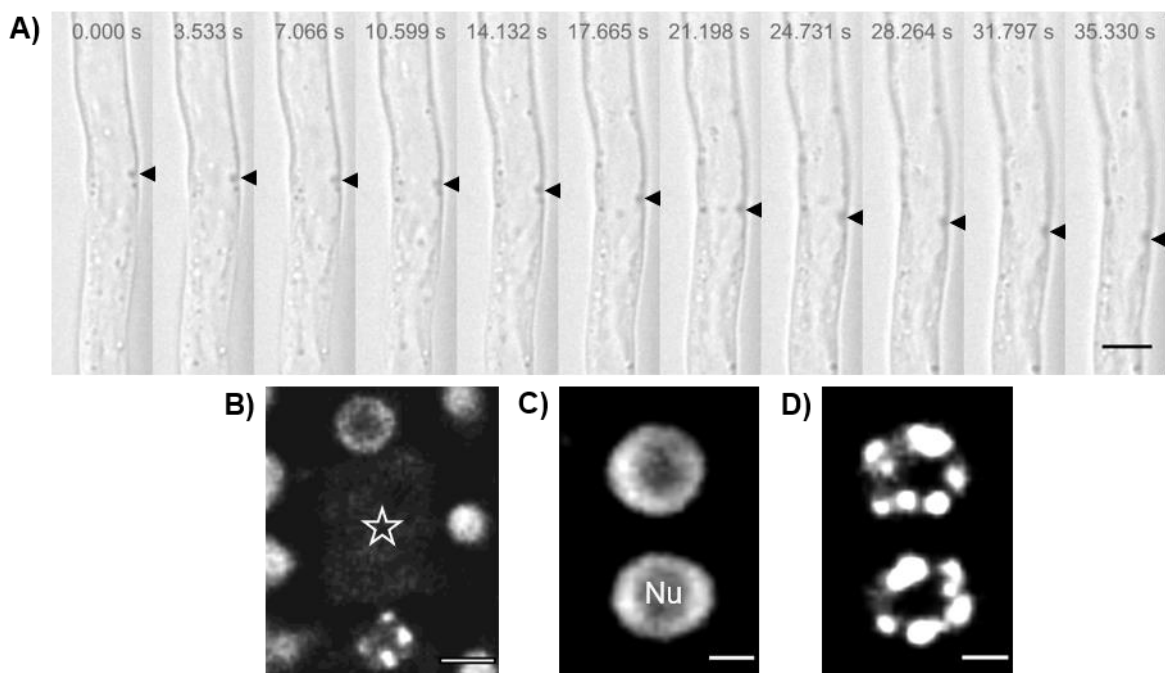


Obrázok 16: Výsledok CAPS testu po restriktčnom štiepení enzýmom *MseI*. Legenda: M – štandard molekulovej hmotnosti; R1–R6 vzorky; Mut – mutant; WT – divoký typ; H – heterozygot.

5.2 SD konfokálna mikroskopia *in vivo* systémov

5.2.1 Fyziologické kontroly a pozorovaný efekt zebularínu

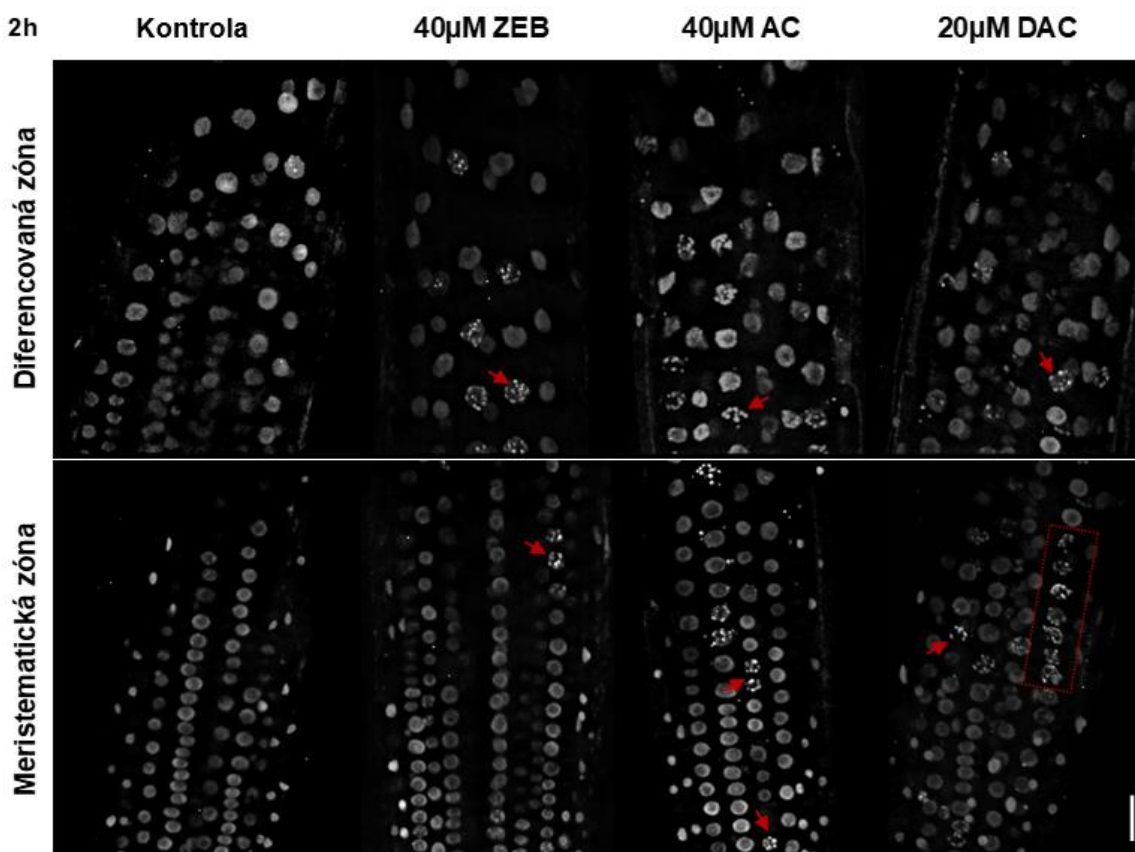
Protokol pre prípravu vzoriek bol natoľko optimalizovaný, že sa nám podarilo simulovať fyziologické podmienky vo vnútri komôrky, kde sa nachádzala adaptovaná rastlina. Dôkazom vyhovujúceho fyziologického stavu koreňka bol na úrovni buniek napr. pohyb cytoplazmy, organel, ale i delenie buniek, vid' Obr. 17. Na úrovni pletiva bolo možné pozorovať rast koreňka. Nenarušené bunkové delenie bolo pre potreby experimentu obzvlášť dôležitým procesom. Pokiaľ bolo možné vidieť deliacu sa bunku, znamenalo to, že bunkový cyklus nebol ovplyvnený a získané výsledky získavajú patričnú vážnosť.



Obrázok 17: Fyziologické kontroly a sledovaný efekt zebularínu na líniu MET1-RFP. A) Pohyb cytoplazmy v koreňovom vlásku. Šípka ukazuje pohyb endozómu v koreňovom vlásku. Snímané v intervale 35 sekúnd. Mierka 10 μm . B) Difúzny signál MET1-RFP v deliacom sa jadre (hviezda). Mierka 5 μm . C) Lokalizácia MET1-RFP v interfáznych jadrách. Nu – jadierko. Mierka 3 μm . D) MET1-RFP *foci* po inkubácii so zebularínom (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Mierka 3 μm .

5.2.2 Analógy báz AC, DAC a ZEB indukujú tvorbu MET1-RFP foci

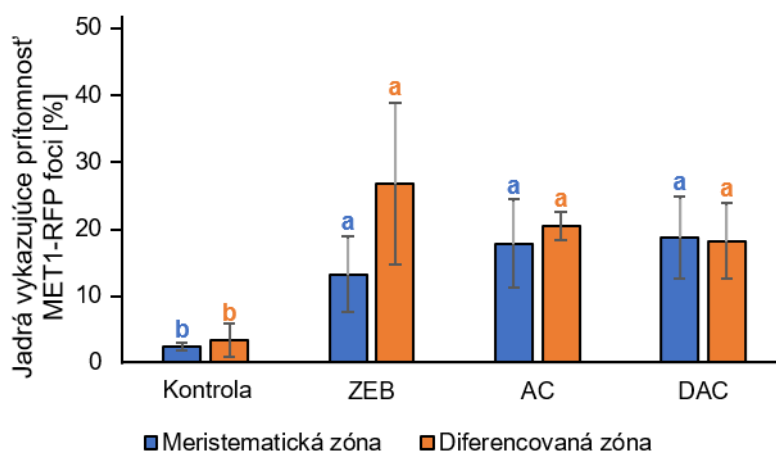
V experimente sme sa snažili porovnať efekt ZEB ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a ďalších analógov báz, t.j. AC ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DAC ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), na líniu exprimujúcu MET1-RFP, vid' Obr. 18. Experiment preukázal u všetkých testovaných látok zmenu oproti kontrole. Po dvoch hodinách inkubácie koreňku s testovanými látkami, došlo k signifikantnému nárastu jadier s MET1-RFP foci v meristematickej a diferencovanej zóne, vid' Graf 1.



Obrázok 18: Diferencovaná a meristematická zóna koreňa *Arabidopsis thaliana*, línia exprimujúca MET1-RFP po ošetrení cytidínovými analógmi. Snímané po dvoch hodinách inkubácie so ZEB ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); AC ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) alebo DAC ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Červená šípka ukazuje na vybrané jadro/á s indukovanými MET1-RFP foci. Obdĺžnik ohraničuje skupinu jadier s indukovanými MET1-RFP foci. Mierka $20 \mu\text{m}$.

Prítomnosť MET1-RFP foci v kontrolných podmienkach bola spočiatku prekvapivá. V porovnaní s analógmi báz išlo o výrazne nižšie množstvo. Naproti tomu, všetky koreňky ktoré boli inkubované so ZEB, AC alebo DAC vykazovali viditeľnú tvorbu MET1-RFP foci. Samozrejme, bolo možné pozorovať rozdiely medzi jednotlivými látkami. V meristematickej zóne bola indukcia MET1-RFP foci po ošetrení zebularínom nižšia než v prípade AC a DAC. Rozdiel medzi AC a DAC nebolo možné z prostého pozorovania určiť. Tak ako v prípade meristematickej zóny, tak aj v diferencovanej zóne koreňa boli v kontrolných podmienkach prítomné MET1-RFP foci. V porovnaní s analógmi báz sa ale jednalo o veľmi nízke množstvo. Zaujímavé ale je, že rozdiel v indukcii MET1-RFP foci medzi ZEB, AC a DAC v diferencovanej zóne nebolo možné vizuálne rozlíšiť.

Po kvantifikácii a následnom štatistickom vyhodnotení sa potvrdili odhady z vizuálneho pozorovania. V kontrolných podmienkach vykazovali približne 3 % jadier prítomnosť MET1-RFP *foci* v meristematickej a diferencovanej zóne, vid' Graf 1 a Tab. 11.



Graf 1: Jadrá s indukovanými MET1-RFP *foci* po vystavení zebularínu (ZEB), 5-azacytidínu (AC) alebo 5-aza-2-deoxycytidínu (DAC). Koncentrácia ZEB ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), AC ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a DAC ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Skupiny líšiace sa písmenom sú signifikantne odlišné ($p < 0,05$). Jednotlivé zóny koreňa neboli medzi sebou porovnávané. Chybové úsečky zostrojené z troch biologických replikátov.

Tabuľka 11: Jadrá vykazujúce MET-RFP *foci* po vystavení zebularínu (ZEB), 5-azacytidínu (AC) alebo 5-aza-2-deoxycytidínu (DAC). Celkom analyzovaných jadier: 2 063.

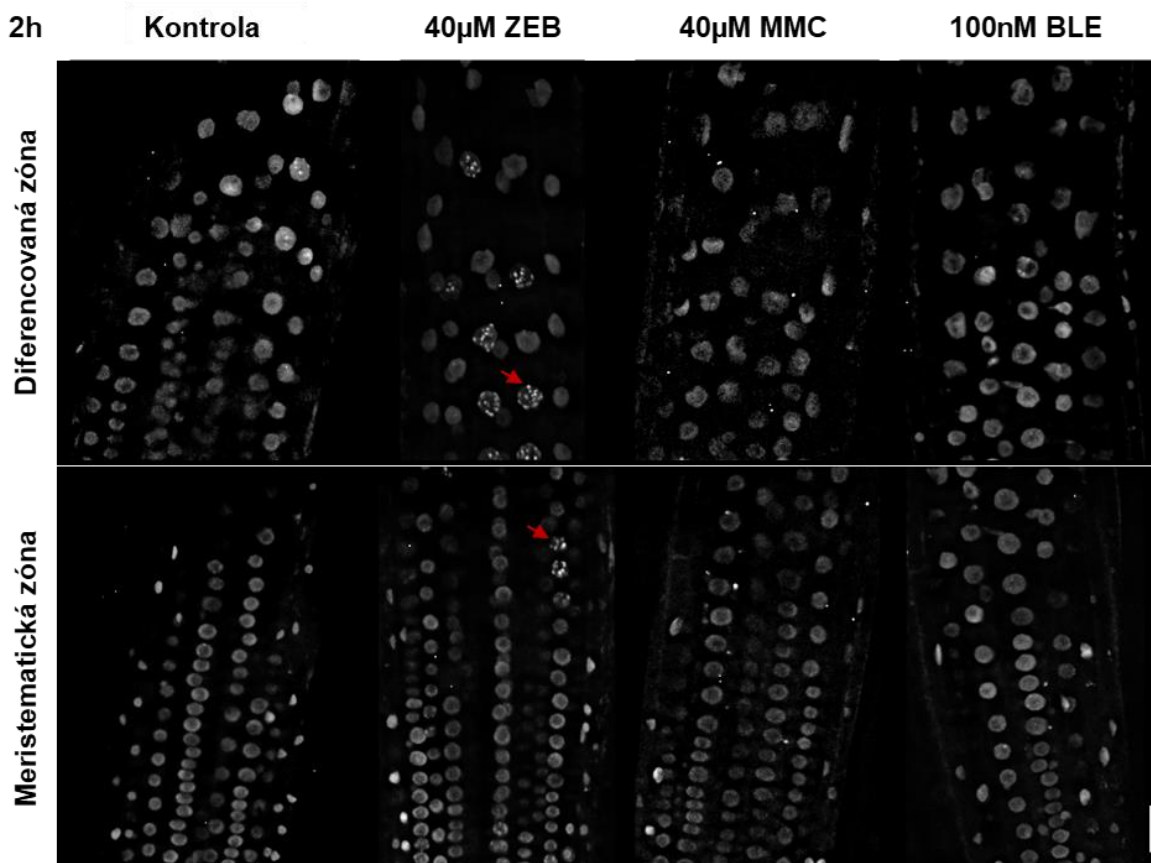
Testovaná látka	Jadrá vykazujúce MET1-RFP <i>foci</i> [%]	
	Meristematická zóna	Diferencovaná zóna
Kontrola	2,4	3,3
40 μM ZEB	13,2	26,7
40 μM AC	17,8	20,4
20 μM DAC	18,7	18,2

Po inkubácii s testovanými látkami došlo v meristematickej zóne k signifikantnému nárastu jadier, ktoré boli pozitívne na MET1-RFP *foci*. Z trojice analógov báz v meristematickej zóne, vykazoval ZEB najnižšie percento jadier s MET1-RFP *foci* a to 13,2 %. Približne rovnaké hodnoty, 17,8 % a 18,7 %, dosahovali AC a DAC.

V diferencovanej zóne taktiež došlo k signifikantným zmenám oproti kontrole. Zatiaľ čo ZEB vykazoval v meristematickej zóne najnižšie percento jadier s MET1-RFP *foci*, tak v diferencovanej zóne nastala situácia opačná. Po ošetrení ZEB vykazovalo 26,7 % jadier prítomnosť MET1-RFP *foci*, zatiaľ čo u AC a DAC to bolo len 20,4 % a 18,2 %.

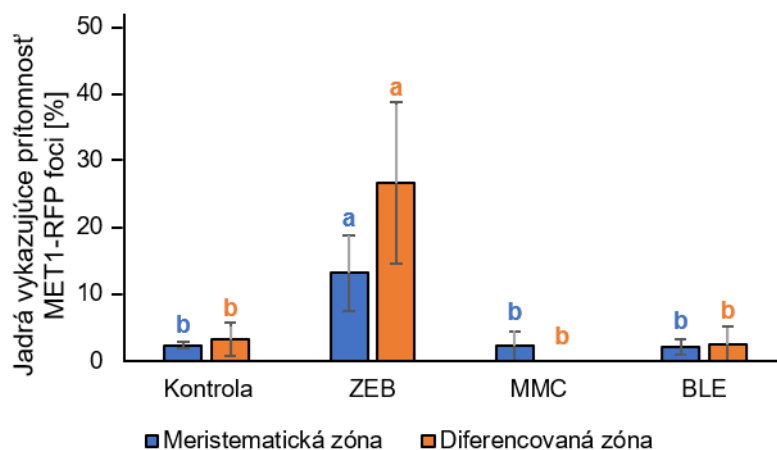
5.2.3 Mitomycín C a ani bleomycín nespôsobujú tvorbu MET1-RFP foci

Týmto experimentom sme chceli zistiť, či pozorovaný efekt je špecifický pre cytidínové analógy alebo i pre iné činidlá poškodzujúce DNA (DDR chemikálie). MET1-RFP líniu sme vstavili efektu ZEB ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), MMC ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) alebo BLE ($100 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). MMC ani BLE neindukovali tvorbu MET1-RFP foci, čo bolo možné vidieť už z mikroskopických dát, vid' Obr. 19. MMC a ani BLE nepreukázali signifikantnú zmenu v porovnaní s kontrolnou situáciou, vid' Graf 2. Výsledky ktoré sme získali súhlasili s očakávaním



Obrázok 19: Diferencovaná a meristematická zóna koreňa *A. thaliana*, línia exprimujúca MET1-RFP po ošetroení DDR chemikáliami. Snímané po dvoch hodinách inkubácie so zebularínom (ZEB, $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); mitomycínom C (MMC, $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) alebo bleomycínom (BLE, $100 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Šípka ukazuje na jadro/á s indukovanými MET1-RFP foci. Mierka $20 \mu\text{m}$.

Následná kvantifikácia a štatistické spracovanie dát potvrdilo predošlú domnienku. Efekt MMC a BLE sa od kontrolných podmienok signifikantne nelíšil, vid' Graf 2 a Tab. 12.



Graf 2: Frekvencia jadier s indukovanými MET1-RFP foci po vystavení zebularínu (ZEB), mitomycínu C (MMC) alebo bleomycínu (BLE). Koncentrácia ZEB ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), MMC ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a BLE ($100 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Skupiny líšiac sa písmenom sú signifikantne odlišné ($p < 0,05$). Jednotlivé zóny koreňa neboli medzi sebou porovnávané. Chybové úsečky zostrojené z troch biologických replikátov.

Meristematická zóna v kontrolných podmienkach a po ošetrení MMC a BLE vykazovala priemerne 2,3 % jadier s MET1-RFP foci. Zatiaľ čo po ošetrení ZEB to bolo 13,2 %.

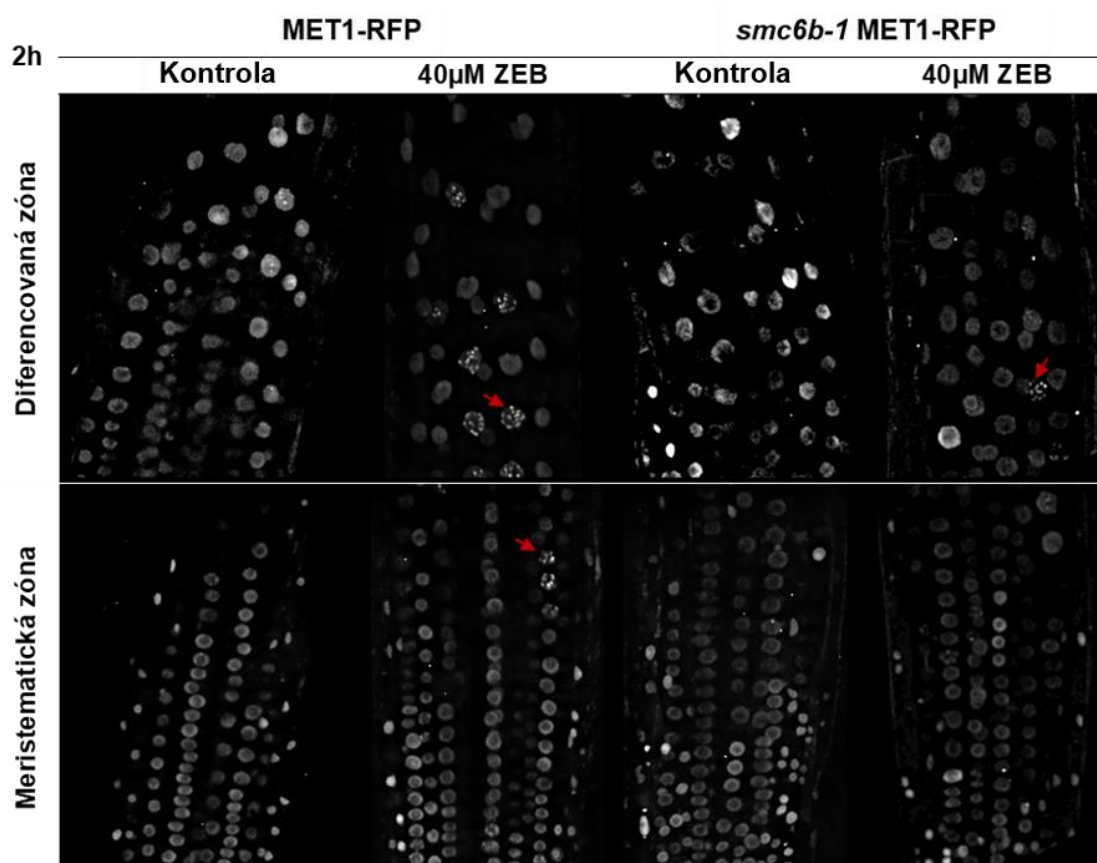
Diferencovaná zóna v kontrolných podmienkach mala 3,3 % jadier pozitívnych na MET1-RFP foci. Po vystavení BLE bolo len 2,6 % jadier pozitívnych na MET1-RFP foci. Po ošetrení MMC nebola zaznamenaná prítomnosť MET1-RFP foci.

Tabuľka 12: Jadrá vykazujúce MET-RFP foci po vystavení zebularínu (ZEB), mitomycínu C (MMC) alebo bleomycínu (BLE). Celkom analyzovaných jadier: 1 873.

Testovaná látka	Jadrá vykazujúce MET1-RFP foci [%]	
	Meristematická zóna	Diferencovaná zóna
Kontrola	2,4	3,3
40 μM ZEB	13,2	26,7
40 μM MMC	2,3	0
100nM BLE	2,2	2,6

5.2.4 Mutácia v géne SMC6B vedie k zmene dynamiky tvorby MET1-RFP foci

Vzhľadom na skutočnosť, že *smc6b-1* vykazuje hypersenzitívny fenotyp po vystavení ZEB (Liu *et al.*, 2015), zaujímalo nás, či nastanú výrazné zmeny v lokalizácii a počte MET1-RFP foci. V experimente sme porovnávali efekt ZEB ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na líniu MET1-RFP a kombinovanú líniu *smc6b-1* MET1-RFP po dvoch hodinách inkubácie. Experiment preukázal signifikantný rozdiel v tvorbe MET1-RFP foci medzi líniami MET1-RFP (divý typ) a *smc6b-1* MET1-RFP (mutant), viď Obr. 20.

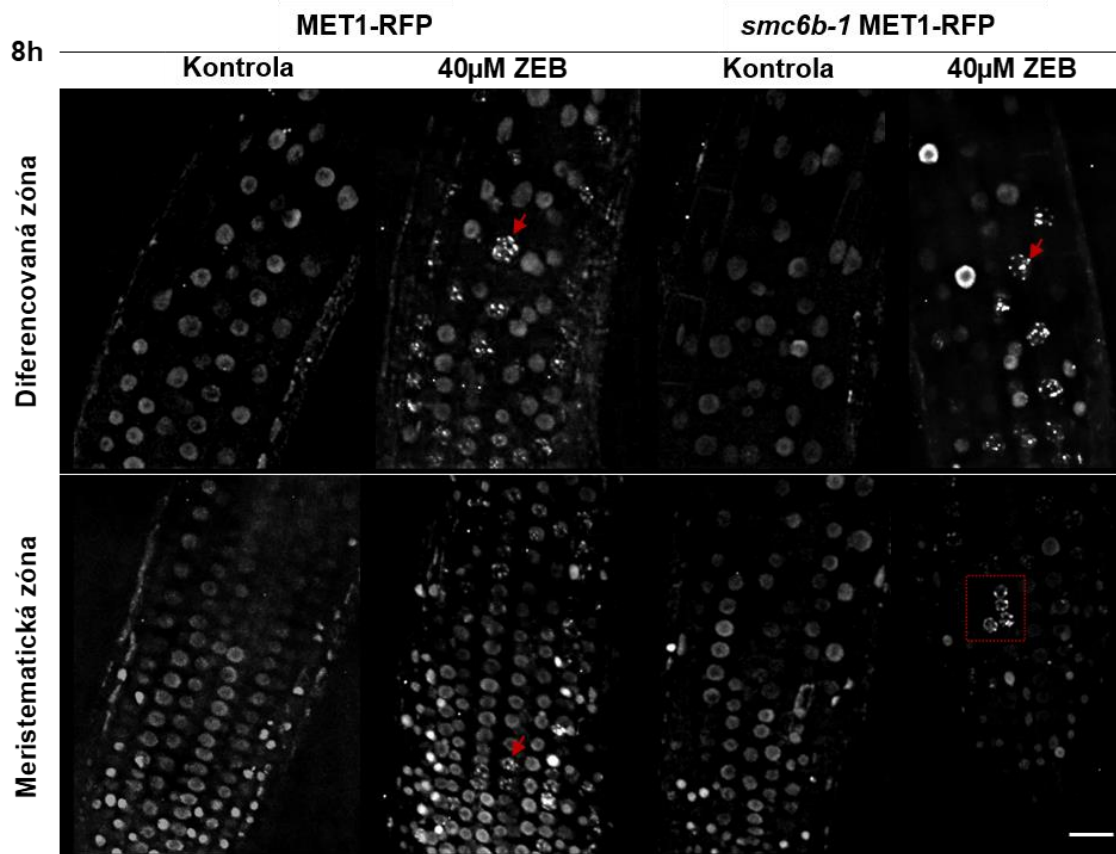


Obrázok 20: Analýza efektu zebularínu na línii MET1-RFP a *smc6b-1* MET1-RFP. Snímané po dvoch hodinách inkubácie so zebularínom (ZEB, $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Šípka ukazuje na jadro/á s indukovanými MET1-RFP foci. Mierka $20 \mu\text{m}$.

V kontrolných podmienkach pri testovaní mutanta nebola zaznamenaná prítomnosť MET1-RFP foci. Po ošetrení ZEB došlo u mutanta k poklesu jadier vykazujúcich MET1-RFP foci v porovnaní s divým typom. Toto pozorovanie nesúhlasilo s tým, čo sme očakávali.

Následné štatistické vyhodnotenie potvrdilo domnienky z mikroskopického pozorovania. U mutanta došlo k redukcii počtu jadier vykazujúcich MET1-RFP foci, a to približne o polovicu, viď Obr. 22A.

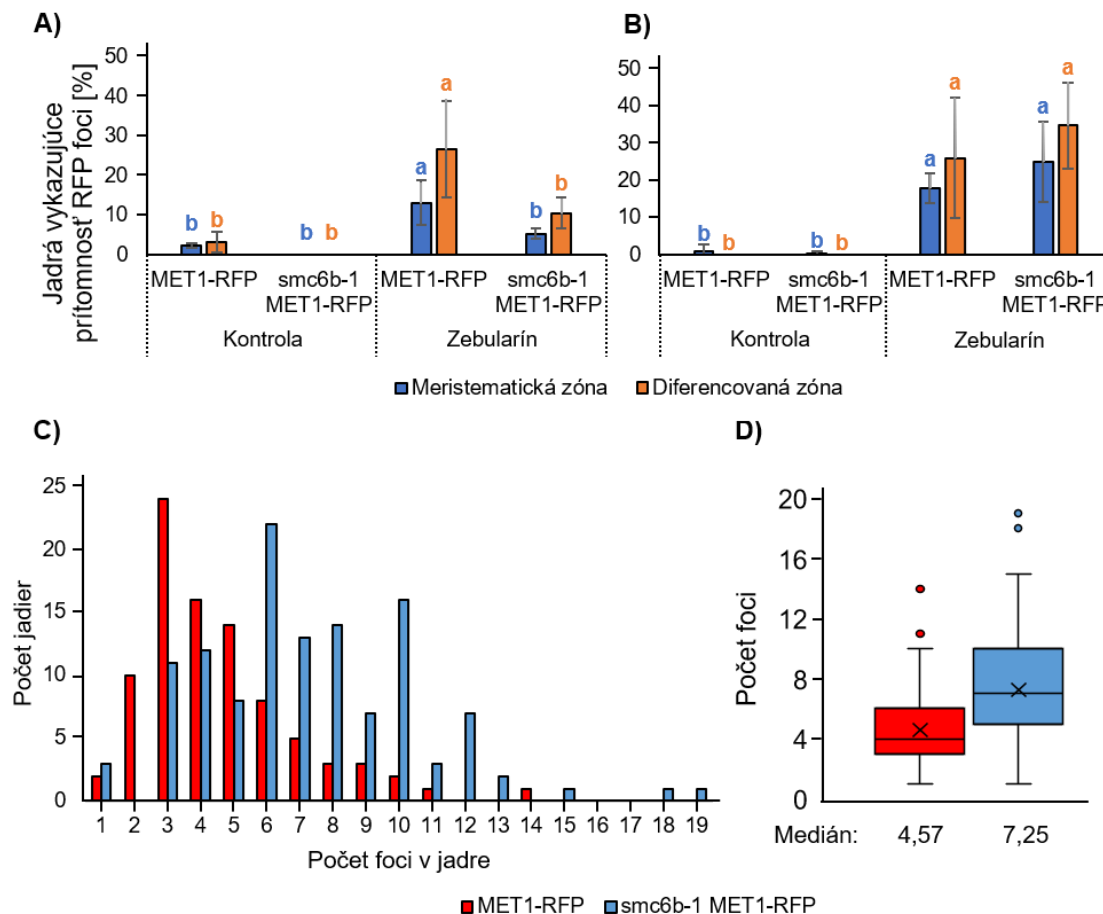
Vzhľadom na výsledok predošlého experimentu sme sa rozhodli predĺžiť čas expozície rastlín zebularínu na osem hodín, viď Obr. 21.



Obrázok 21: Analýza efektu zebularínu na línii MET1-RFP a *smc6b-1* MET1-RFP. Snímané po ôsmich hodinách inkubácie so zebularínom (ZEB, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Červená šípka/štvorec ukazujú na jadro/á s indukovanými MET1-RFP *foci*. Mierka 20 μm .

Rozdiely v množstve jadier pozitívnych na MET1-RFP *foci* medzi divým typom a mutantom sa na prvý pohľad nelíšili, to platilo pre obidve zóny koreňa. Rozdiel, ktorý ale bolo možné pozorovať bolo množstvo MET1-RFP *foci* v jadre. U mutantu to vypadalo, že dochádza v jadrách k indukcií väčšieho množstva MET1-RFP *foci*. Kvantifikácia a štatistické vyhodnotenie dát potvrdilo domnienky, vid' Obr. 22B, C a D. V kontrolných podmienkach u mutantu nedochádzalo k tvorbe MET1-RFP *foci* ani po ôsmich hodinách inkubácie. Po inkubácii so zebularínom mutant vykazoval nárast v indukcií MET1-RFP *foci*, ale táto zmena nebola signifikantná v porovnaní s divým typom.

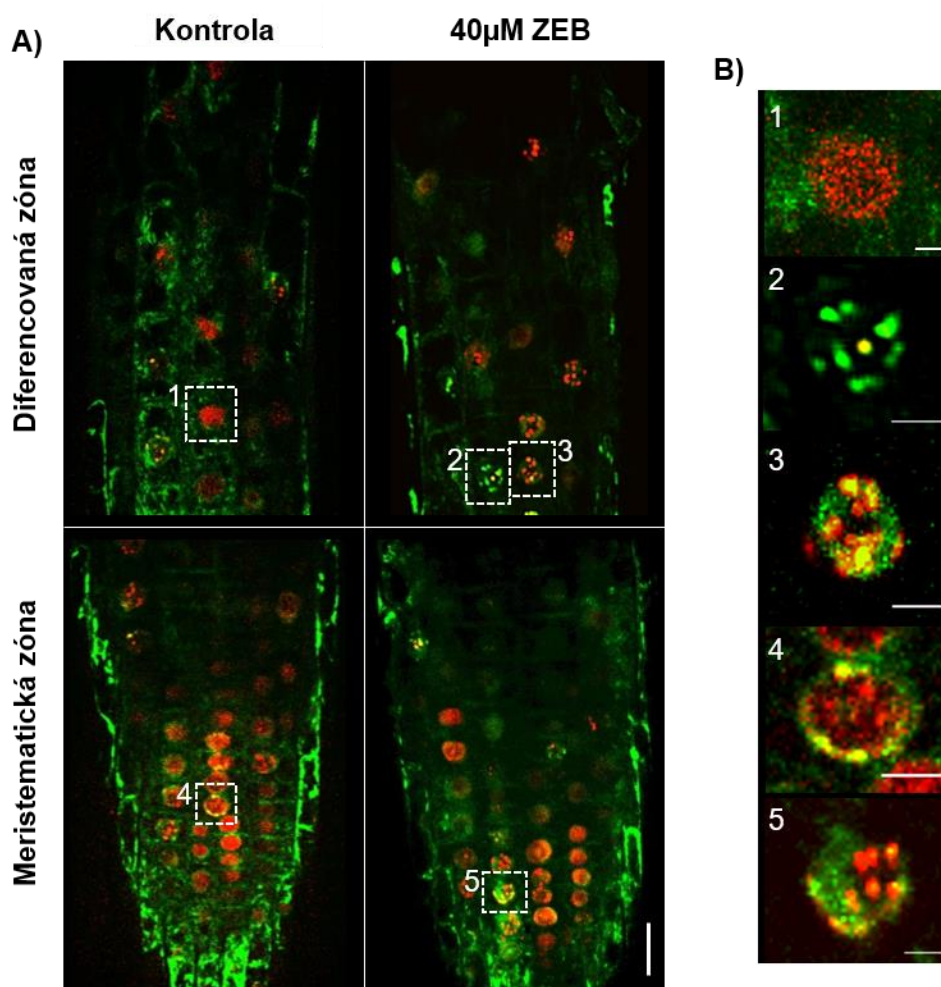
Trend väčšieho množstva MET1-RFP *foci* v jadre je možné vidieť na Obr. 22C. V jadrách divého typu bolo možné najčastejšie pozorovať 3–5 MET1-RFP *foci*, pričom jadrá, ktoré mali viac ako päť *foci* boli zriedkavé. U línii *smc6b-1* MET1-RFP je možné pozorovať opačný trend, a teda nárast počtu MET1-RFP *foci* v jadrách nad hodnotu 5, vid' Obr. 22D.



Obrázok 22: Porovnanie efektu zebularínu (ZEB) na línii MET1-RFP a *smc6b-1* MET1-RFP po dvoch a ôsmich hodinách inkubácie. A) Zastúpenie jadier pozitívnych na prítomnosť MET1-RFP foci po dvoch hodinách inkubácie so ZEB (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Analyzovaných jadier: 1 960. B) Zastúpenie jadier pozitívnych na prítomnosť MET1-RFP foci po ôsmich hodinách inkubácie so ZEB (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Analyzovaných jadier: 1 668. Skupiny líšiac sa písmenom sú signifikantne odlišné ($p < 0,05$). Zóny koreňa neboli medzi sebou porovnávané. Chybové úsečky sú zostrojené z troch biologických replikátov. C) Absolútne zastúpenie jadier s 1–19 MET1-RFP foci v meristematickej a diferencovanej zóne koreňa spoločne. D) Variabilita v počte MET1-RFP foci v jadre. Počet analyzovaných jadier s MET1-RFP foci: MET1-RFP ($n = 89$); *smc6b-1* MET1-RFP ($n = 121$).

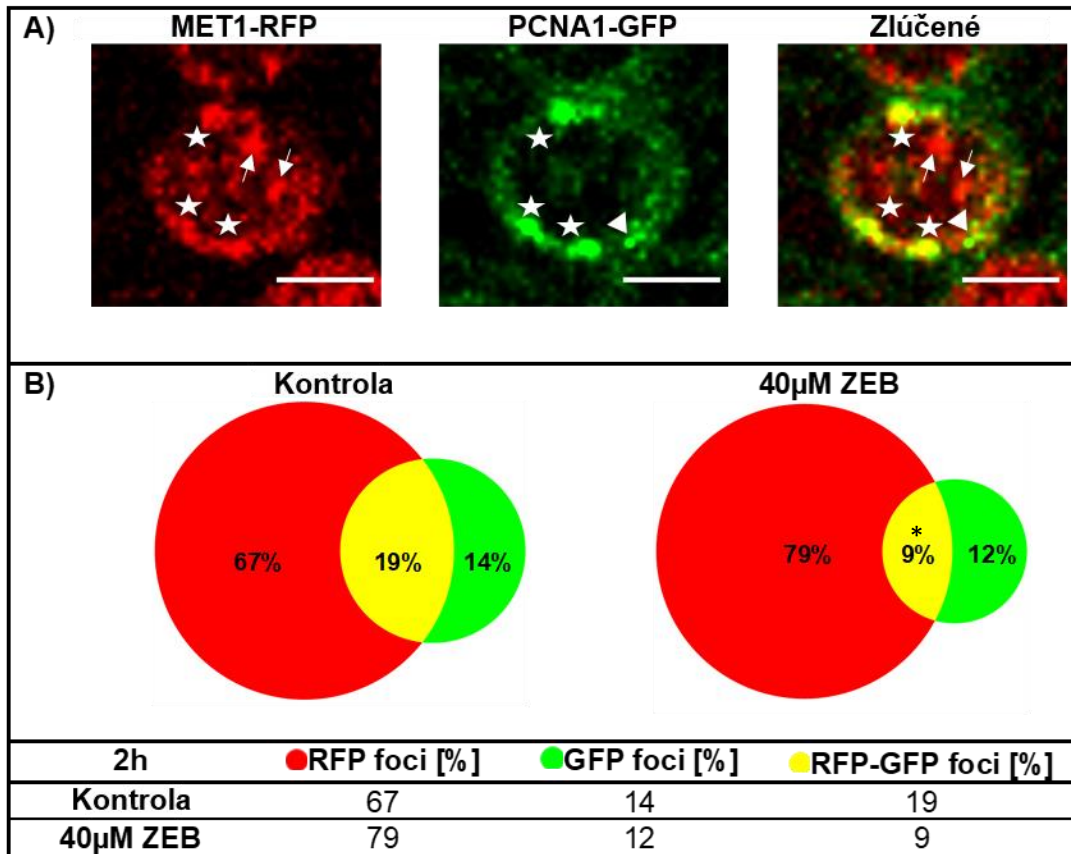
5.2.5 Vplyv zebularínu na lokalizáciu PCNA1-GFP

U cicavcov bol preukázaný pokles v kolokalizácii Dnmt1 a PCNA po vystavení DAC (Schermelleh *et al.*, 2007). Zaujímalo nás, či aj u rastlín je možné pozorovať podobný vzor chovania proteínov MET1 a PCNA1 po pôsobení zebularínu, keďže sa taktiež jedná o cytidínový analog. Túto otázku sme sa rozhodli otestovať pomocou pripravenej línie MET1-RFP PCNA1-GFP a jej ošetrením ZEB ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, po dobu dvoch hodín). Efekt zebularínu je možné pozorovať na Obr. 23A a B.



Obrázok 23: Efekt zebularínu (ZEB) na líniu MET1-RFP PCNA1-GFP. A) Snímky meristematickej a diferencovanej zóny koreňa v kontrolnom a zebularínom ovplyvnenej vzorku ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, inkubácia po dobu dvoch hodín). Označené časti ukazujú jadrá, ktorých detail je možné vidieť v ďalšej časti figúry. Mierka $20 \mu\text{m}$. B) Variabilita pozorovaných vzorov jadier. Mierka $3 \mu\text{m}$.

Zaujímavým výsledkom bola pozorovaná variabilita jadier, či už v kontrolných alebo experimentálnych podmienkach, vid' Obr. 23B. Prvé experimenty taktiež odhalili komplikáciu vo forme semienkového fluorescenčného markeru, ktorý je bohužiaľ nešpecifický a poskytuje silný cytoplazmatický signál i v klíčiach rastlín. Kvôli tomu bola následná kvantifikácia dát sťažená, vid' Obr. 24.



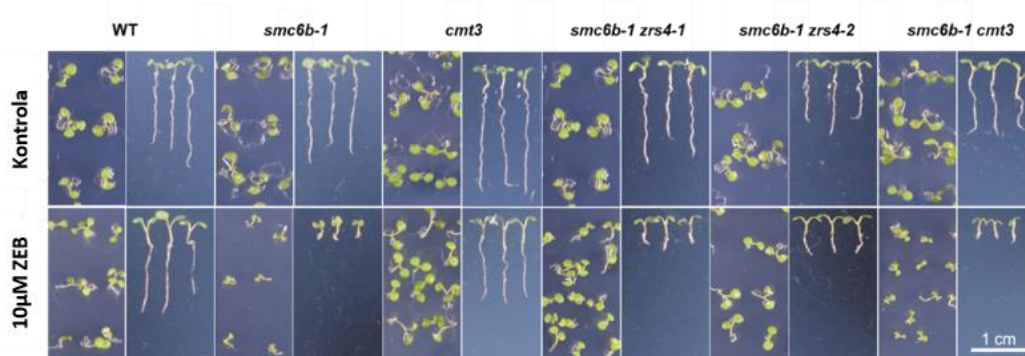
Obrázok 24: Efekt zebularínu na vzájomnú lokalizáciu MET1-RFP a PCNA1-GFP v jadre po dvoch hodinách inkubácie. A) Detail jadra s lokalizáciou MET1-RFP a PCNA1-GFP *foci*. Kolokalizácia signálov (hviezda), nekolokalizujúci signál MET1-RFP (šípka), nekolokalizujúci signál PCNA1-GFP (trojuholník). Mierka 5 µm. B) Zobrazenie vzťahu kolokalizácie fluorescenčných markerov. Diagrami sú zhotovené z piatich biologických replík. Celkový počet analyzovaných jadier: Kontrola, n = 744; ZEB, n = 695.

V kontrolnej situácii vykazovalo 19 % *foci* kolokalizáciu fluorescenčných signálov MET1-RFP a PCNA1-GFP. Frekvencia výlučne MET1-RFP *foci* je u 67 %, zatiaľ čo frekvencia PCNA1-GFP *foci* predstavovala 14 %.

Korienky po inkubácii so ZEB vykazujú pokles vo frekvencii prekrývajúcich sa signálov, iba 9 % *foci* sa prekrývalo. Táto zmena je signifikantná ($p < 0,05$). Ďalej je možné pozorovať relatívny nárast MET1-RFP *foci* (79 %). Frekvencia PCNA1-GFP nebola nijak výrazne ovplyvnená (12 %).

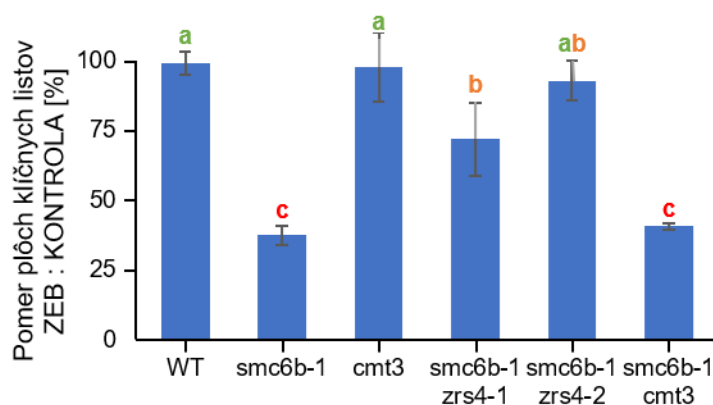
5.2.6 Analýza vplyvu zebularínu na metyltransferázových mutantov

Cieľom experimentu bolo poskytnúť informácie či aj iná rastlinná DNA metyltransferáza, v tomto prípade CMT3, tvorí DPC. Boli vyselektované dvojité homozygotné línie *smc6b-1 zrs4-1*, *smc6b-1 zrs4-2* a *smc6b-1 cmt3* a následne boli vystavené ZEB ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), vid' Obr. 25.



Obrázok 25: Fenotypy 10-dňových mutantných línií po ošetrení zebularínom (ZEB). Legenda: WT – divý typ.

Identifikovaní kandidáti *smc6b-1 zrs4-1* a *smc6b-1 zrs4-2* majú, v porovnaní s mutantom *smc6b-1*, dlhší koreňok a väčšiu plochu klíčnych listov, vid' Obr. 25 (Prochazkova, Finke *et* Pecinka, nepublikované). Fenotypový prejav koreňka nebol ďalej analyzovaný z dôvodu, že nedošlo k výraznému potlačeniu hypersenzitívneho fenotypu *smc6b-1*. Druhým fenotypovým prejavom, na základe ktorého boli títo kandidáti identifikovaní je plocha klíčnych lístkov, ktorá sa javila byť veľmi podobná divému typu. Po zmeraní plochy klíčnych lístkov a následnom štatistickom spracovaní dát, je možné pozorovať potlačenie hypersenzitívneho fenotypu *smc6b-1* mutácie, vid' Graf 3. U línie *smc6b-1 zrs4-1* došlo k zväčšeniu plochy klíčnych listov o 34 % a u línie *smc6b-1 zrs4-2* až o 55 %. Línia *smc6b-1 cmt3* nepotláča hypersenzitívny fenotyp mutantu *smc6b-1*. Rozdiel v pomere klíčnych lístov predstavuje len 3 %, čo nie považované za signifikantnú zmenu.



Graf 3: Pomer plôch klíčnych listov deficientných metyltransferázových mutantov po ošetrení zebularínom (ZEB, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Skupiny líšiace sa písmenom sú signifikantne odlišné ($p < 0,05$). Chybové úsečky zostrojené z troch biologických replík. WT – divý typ.

6 DISKUSIA

Vypracovaná rešerš na tému poškodenie DNA, so zameraním na DNA-proteínovú väzbu, sa opiera o práce podniknuté na rôznych modelových organizmoch. Mnohokrát sa jedná o kvasinkové alebo cicavčie systémy, na ktorých bolo podniknutých veľké množstvo štúdií zaoberajúcich sa problematikou DNA-proteínovej väzby a jej opravy. U rastlinných systémov zatiaľ takéto práce chýbajú, a preto je mnoho informácií extrapolovaných na rastliny.

6.1 Selekcia rastlinných systémov

Selekcia systémov v F2 a F3 generácii neprebíhala vždy podľa očakávaní. Odchýlky od teoretických výsledkov je možné brať ako kombináciu vplyvu malej populácie a letálnosti homozygotov *met1*.

V rámci vývoja mikroskopického systému boli selektované i ďalšie kombinované línie. Z dôvodov komplikácií vzniknutých pri selekcii a s ohľadom na časové možnosti bola práca s nimi pozastavená. Ich ďalšou selekciou je možné nadviazať na túto prácu.

6.2 Mikroskopia *in vivo* systémov

6.2.1 Línia MET1-RFP

Prítomnosť malého množstva jadier s MET1-RFP *foci* v kontrolných podmienkach by mohlo indikovať dva javy. V prvom prípade by sa mohlo jednať o chromocentrá. Druhým javom môže byť prítomnosť DNA-proteínovej väzby ako následok fyziologických dejov v bunke, napr. peroxidácia lipidov alebo prítomnosť ROS (Barker *et al.*, 2005; Ide *et al.*, 2018).

Jedným z argumentov v prospech DPC je fakt, že efekt cytidínových analógov zebularínu, 5-azacytidínu a 5-aza-2-deoxycytidínu je podľa získaných výsledkov podobný, či už v *in vitro* podmienkach alebo v eukaryotických *in vivo* systémoch. (Santi *et al.*, 1984; Schermelleh *et al.*, 2007; Champion *et al.*, 2010). Prekvapením bolo zistenie, že efekt DAC sa nelíšil od AC. Očakávali sme vyššie percento jadier s indukovanými MET1-RFP *foci*. Príčinou tejto domnienky bol fakt, že tento analóg nemusí byť aktivitou ribonukleotidreduktáz redukovaný v pozícii 2' a môže byť priamo zaradený do DNA.

Pomocou MMC a BLE sme chceli zistiť, či jav vyvolaný zebularínom je špecifický len pre zebularín alebo i pre iné chemikálie poškodzujúce DNA. Výsledky neukazujú významný rozdiel v indukcii MET1-RFP *foci* v porovnaní s kontrolou. Tieto chemikálie teda nemajú vplyv na indukcii tvorby MET1-RFP *foci*. Výsledok tohto experimentu poukazuje na fakt, že zebularín zrejme poškodzuje DNA iným mechanizmom než testované chemikálie. Pomocou týchto látok sa nám podarilo vyradiť DNA poškodenia ako sú: jednoret'azcové a dvojret'azcové zlomy, vnútroret'azcové a medziret'azcové väzby v molekule DNA.

K získaniu ďalších informácií by mohla prispieť selektovaná línia obsahujúca MET1-RFP a RAD54-EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein, EYFP) (Hirakawa *et al.* Matsunaga, 2019).

Fluorescenčný marker RAD54-EYFP je chromatín remodelujúcim faktorom, ktorý hrá dôležitú úlohu v homológnej rekombinácii. Keďže homológna rekombinácia je potvrdená ako jedna z dráh učastniaca sa v oprave DPC, tak v prípade kolokalizácie týchto dvoch markerov, by bolo možné vyvodiť záver, že MET1-RFP *foci* je poškodením DNA a nie napr. nejaká degradovaná štruktúra alebo chromocentrum.

6.2.2 Experimenty s líniou *smc6b-1* MET1-RFP

V prvom nastavení experimentu sme pozorovali pokles vo frekvencii jadier pozitívnych na prítomnosť MET1-RFP *foci* po dvojhodinovom pôsobení zebularínu. Tento výsledok bol v rozpore s naším očakávaním. Keďže SMC6B sa zdá byť jedným z kľúčových reparačných faktorov pozorovaného poškodenia, domnievali sme sa, že deficiencia v tomto géne by mohla viesť k zlyhaniu opravy poškodenia DNA vyvolaného zebularínom. Toto zlyhanie by sa mohlo prejaviť zvýšeným počtom jadier pozitívnych na MET1-RFP *foci*. Ďalším efektom, ktorý sme očakávali bolo väčšie množstvo MET1-RFP *foci* v jadrách. S ohľadom na získané výsledky po dvojhodinovej inkubácii rastlín so zebularínom, sme sa rozhodli predĺžiť dobu expozície na osem hodín.

Po ôsmich hodinách došlo k výraznému nárastu vo frekvencii jadier pozitívnych na MET1-RFP *foci*. Jednou z možností oneskoreného nástupu efektu zebularínu by mohla byť skutočnosť, že SMC5/6 ako reparačný faktor potrebuje na opravu tohto poškodenia viac času (Kozak *et al.*, 2009).

Ďalší zaujímavý výsledok poskytla analýza závislosti počtu jadier a množstva MET1-RFP *foci* v týchto jadrách. Jadrá mutanta *smc6b-1* vykazujú väčšie množstvo MET1-RFP *foci* v porovnaní s divým typom.

Ako už bolo zmienené, aktuálne sa v procese selekcie nachádza niekoľko ďalších *in vivo* systémov. Medzi ne patrí napríklad systém, kde sa nachádza centromerický marker EYFP-CENH3 (Centromeric Histone 3) (Lermontova *et al.*, 2006). Pomocou tohto systému by bolo možné rozlíšiť, či nejaká časť MET1-RFP *foci* je následok efektu zebularínu a nie následok prítomnosti chromocentra. V prípade, že by sa veľké množstvo zebularínom indukovaných MET1-RFP *foci* tvorili práve v chromocentrách, vysvetľovalo by to veľkosť pozorovaných signálov v jadrách.

Ďalšie systémy obsahujú mutáciu v géne DDM1 (DECREASED DNA METHYLATION 1). Tento mutant bol taktiež identifikovaný v ZRS screene, a jeho úloha v tvorbe DPC je zatiaľ predmetom výskumu (Prochazkova, Finke *et Pecinka*, nepublikované). DDM1 je chromatín remodelujúci komplex, ktorý sprístupňuje DNA enzýmom. Pokiaľ dôjde k jeho deficiencii, tak napr. MET1 nie je schopná metylovať nové vlákno DNA. V pripravovanom systéme *ddm1* MET1-RFP by sme teda očakávali pokles v tvorbe MET1-RFP *foci*. Pokiaľ by sme takýto systém vystavili zebularínu, nedošlo by k zachyteniu MET1 a *de facto* by nedošlo ani k indukcii tvorby MET1-RFP *foci*.

6.2.3 Zebularín indukuje separáciu signálov MET1-RFP a PCNA1-GFP

Výsledky naznačujú, že zebularín špecificky zachytáva MET1 na molekule DNA a priamo neovplyvňuje postup replikačného aparátu. Toto tvrdenie je podporené výsledkom, kedy došlo k nárastu množstva MET1-RFP *foci*, ktoré nekolocalizovali s PCNA1-GFP. Získané výsledky sú v súlade s prácou na cicavcoch, kde autori tvrdia, že Dnmt1 je asociovaná s PCNA a imobilizácia Dnmt1 neovplyvňuje postup replikačného aparátu (Schermelleh *et al.*, 2007).

6.3 Analýza fenotypu metyltransferázových mutantov

Podľa dosiahnutých výsledkov sa zdá, že zebularín indukuje zachytenie MET1 na molekule DNA, tj. indukuje DPC (Prochazkova, Finke et Pecinka, nepublikované). Toto tvrdenie sa zakladá na pozorovanom fenotype kandidátov *zrs4-1* a *zrs4-2* v genetickom pozadí *smc6b-1*. Po ošetrení zebularínom došlo k potlačeniu hypersenzitívneho fenotypu mutácie *smc6b-1*. *Zrs4-1* je pravdepodobne slabšia mutácia v géne MET1, ktorá mierne potlačuje fenotyp dĺžky korenia a výrazne potlačuje fenotyp plochy kľúčnych lístkov v porovnaní s mutantom *smc6b-1*. *Zrs4-2* je mutácia, ktorá taktiež mierne potlačuje fenotyp dĺžky korenia a takmer úplne potláča fenotyp plochy kľúčnych listov v porovnaní s mutantom *smc6b-1*. Keďže sú títo kandidáti deficientní v géne *met1*, tak po vystavení zebularínu nedochádza k zachyteniu MET1 na molekule DNA, čo vedie k pozorovanému fenotypu.

Mutácia v géne CMT3 nepotláča *smc6b-1* hypersenzitívny fenotyp po vystavení zebularínu. Je teda pravdepodobné, že CMT3 DNA metyltransferáza nie je ovplyvňovaná zebularínom a nepodieľa sa na tvorbe DNA-proteínovej väzby.

7 ZÁVER

Plodný výskum v oblasti poškodenia a opráv DNA viedol k charakterizácii mnohých poškodení a reparačných mechanizmov naprieč všetkými modelovými organizmami. Typ poškodenia DNA, ktorému sa až v posledných rokoch dostalo veľkej pozornosti je DNA-proteínová väzba. Vznik a oprava tohto špecifického poškodenia DNA je pomerne dobre popísaná u živočíšnych a kvasinkových systémov (zhrnuté v Stingele *et al.*, 2017; Hacker *et al.*, 2020). Naproti tomu u rastlín ostáva mnoho detailov neobjasnených.

Vypracovanie experimentálnej časti tejto bakalárskej práce bolo realizované na Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci a v laboratóriu profesora Šamaja, ktoré je súčasťou Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum.

Pri plnení cieľov tejto bakalárskej práce som sa naučil správne navrhnuť experiment a pochopil som nezastupiteľnú úlohu kontrol v experimentoch. Medzi najdôležitejšie metódy, ktoré som si osvojil patrí mikroskopia živých systémov za využitia konfokálnej mikroskopie s rotujúcim diskom a PCR genotypizácia rôznych typov mutantov.

V tejto práci som sa snažil naviazať na aktuálne poznatky za účelom vyvinuť rastlinné systémy pre štúdium DNA-proteínovej väzby po pôsobení látky zebularín. Pomocou týchto systémov sa mi podarilo preukázať, že zebularín špecificky indukuje tvorbu MET1-RFP *foci* a vplýva na separáciu signálov MET1-RFP a PCNA1-GFP. Zmena dynamiky tvorby MET1-RFP *foci* u línie *smc6b-1* MET1-RFP poukazuje na dôležitosť SMC6B v oprave tohto poškodenia.

Výsledky tejto práce poskytujú dobré základy pre ďalšie štúdium DNA-proteínovej väzby u rastlín po pôsobení zebularínu a úlohy SMC6B v oprave tohto poškodenia.

8 LITERATÚRA

- Barker, S., Weinfeld, M., Murray, D. (2005): DNA-protein crosslinks: Their induction, repair, and biological consequences. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 589: 111–135.
- Bartee, L., Malagnac, F., Bender, J. (2001): Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes and Development* 15: 1753–1758.
- Baubec, T., Pecinka, A., Rozhon, W., Mittelsten Scheid, O. (2009): Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine. *Plant Journal* 57: 542–554.
- Bleuyard, J.Y., Gallego, M.E., White, C.I. (2006): Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. *DNA Repair* 5: 1–12.
- Boddy, M.N., Gaillard, P.H.L., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates, J.R., Russell, P. (2001): Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* 107: 537–548.
- Bray, C.M., West, C.E. (2005): DNA repair mechanisms in plants: Crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytologist* 168: 511–528.
- Britt, A.B. (1995): Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiology* 108: 891–896.
- Britt, A.B. (1999): Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in Plant Science* 4: 20–25.
- Canturk, F., Karaman, M., Selby, C.P., Kemp, M.G., Kulaksiz-Erkmen, G., Hu, J., Li, W., Lindsey-Boltz, L.A., Sancar, A. (2016): Nucleotide excision repair by dual incisions in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 4706–4710.
- 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.
- Chowdhury, D., Choi, Y.E., Brault, M.E. (2013): Charity begins at home: Non-coding RNA functions in DNA repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14: 181–189. Nature Publishing Group.
- Confalonieri, M., Faè, M., Balestrazzi, A., Donà, M., Macovei, A., Valassi, A., Giraffa, G., Carbonera, D. (2014): Enhanced osmotic stress tolerance in *Medicago truncatula* plants overexpressing the DNA repair gene *MtTdp2α* (tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 116: 187–203.
- Dany, A.L., Douki, T., Triantaphylides, C., Cadet, J. (2001): Repair of the main UV-induced thymine dimeric lesions within *Arabidopsis thaliana* DNA: Evidence for the major involvement of photoreactivation pathways. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 65: 127–135.
- Desai, S.D., Li, T.K., Rodriguez-Bauman, A., Liu, L.F., Rubin, E.H. (2001): Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer Research* 61: 5926–5932.
- Desai, S.D., Liu, L.F., Vazquez-Abad, D., D'Arpa, P. (1997): Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin. *Journal of Biological Chemistry* 272: 24159–24164.
- Díaz, M., Pečinková, P., Nowicka, A., Baroux, C., Sakamoto, T., Gandha, P.Y., Jeřábková, H., Matsunaga, S., Grossniklaus, U., Pecinka, A. (2019): The SMC5/6 complex subunit NSE4A is involved in DNA damage repair and seed development. *Plant Cell* 31: 1579–1597.

- Doe, C.L., Ahn, J.S., Dixon, J., Whitby, M.C. (2002): Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks. *Journal of Biological Chemistry* 277: 32753–32759.
- Duxin, J.P., Dewar, J.M., Yardimci, H., Walter, J.C. (2014): Repair of a DNA-protein crosslink by replication-coupled proteolysis. *Cell* 159: 346–357. Elsevier Inc.
- Easwaran, H.P., Schermelleh, L., Leonhardt, H., Cardoso, M.C. (2004): Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases. *EMBO Reports* 5: 1181–1186.
- Ehrlich, M. (2002): DNA methylation in cancer: Too much, but also too little. *Oncogene* 21: 5400–5413.
- Enderle, J., Dorn, A., Beying, N., Trapp, O., Puchta, H. (2019a): The protease WSS1A, the endonuclease MUS81, and the phosphodiesterase TDP1 are involved in independent pathways of DNA-protein crosslink repair in plants. *Plant Cell* 31: 775–790.
- Enderle, J., Dorn, A., Puchta, H. (2019b): DNA- and DNA-protein-crosslink repair in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1–19.
- Ferrara, L., Kmiec, E.B. (2004): Camptothecin enhances the frequency of oligonucleotide-directed gene repair in mammalian cells by inducing DNA damage and activating homologous recombination. *Nucleic Acids Research* 32: 5239–5248.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D’Errico, M., Simonelli, V., Dogliotti, E. (2003): The base excision repair: Mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie* 85: 1053–1071.
- Gaillard, P.H.L., Noguchi, E., Shanahan, P., Russell, P. (2003): The endogenous Mus81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism. *Molecular Cell* 12: 747–759.
- Gaskell, L.J., Osman, F., Gilbert, R.J.C., Whitby, M.C. (2007): Mus81 cleavage of Holliday junctions: A failsafe for processing meiotic recombination intermediates? *EMBO Journal* 26: 1891–1901.
- Geuting, V., Kobbe, D., Hartung, F., Diirr, J., Focke, M., Puchta, H. (2009): Two distinct MUS81-EME1 complexes from arabidopsis process holliday junctions1[w]. *Plant Physiology* 150: 1062–1071.
- Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., Bestor, T.H. (2006): Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311: 395–398.
- Gómez-Herrerros, F., Romero-Granados, R., Zeng, Z., Álvarez-Quilón, A., Quintero, C., Ju, L., Umans, L., Vermeire, L., Huylebroeck, D., Caldecott, K.W., Cortés-Ledesma, F. (2013): TDP2-Dependent Non-Homologous End-Joining Protects against Topoisomerase II-Induced DNA Breaks and Genome Instability in Cells and In Vivo. *PLoS Genetics* 9.
- de Graaf, B., Clore, A., McCullough, A.K. (2009): Cellular pathways for DNA repair and damage tolerance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks. *DNA Repair* 8: 1207–1214.
- Hacker, L., Dorn, A., Puchta, H. (2020): Repair of DNA-protein crosslinks in plants. *DNA Repair* 87: 102787. Elsevier.
- Hirakawa, T., Matsunaga, S. (2019): Characterization of DNA Repair Foci in Root Cells of Arabidopsis in Response to DNA Damage. *Frontiers in Plant Science* 10.
- Hirano, T. (2006): At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 311–322.

- Hoeijmakers, J.H.J. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366–374.
- Houtgraaf, J.H., Versmissen, J., van der Giessen, W.J. (2006): A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine* 7: 165–172.
- Hu, Z., Cools, T., De Veylder, L. (2016): Mechanisms Used by Plants to Cope with DNA Damage. *Annual Review of Plant Biology* 67: 439–462.
- 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. Elsevier B.V.
- 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 - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711: 113–122. Elsevier B.V.
- Interthal, H., Heyer, W.D. (2000): MUS81 encodes a novel helix-hairpin-helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* 263: 812–827.
- IYER, V.N., SZYBALSKI, W. (1963): a Molecular Mechanism of Mitomycin Action: Linking of Complementary Dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 50: 355–362.
- Jeppsson, K., Kanno, T., Shirahige, K., Sjögren, C. (2014): The maintenance of chromosome structure: Positioning and functioning of SMC complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15: 601–614. Nature Publishing Group.
- Jullien, P.E., Susaki, D., Yelagandula, R., Higashiyama, T., Berger, F. (2012): DNA methylation dynamics during sexual reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 22: 1825–1830.
- Kimura, S., Sakaguchi, K. (2006): DNA repair in plants. *Chemical Reviews* 106: 753–766.
- Kozak, J., West, C.E., White, C., da Costa-Nunes, J.A., Angelis, K.J. (2009): Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis thaliana* is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance. *DNA Repair* 8: 413–419.
- Krokan, H.E., Bjoras, M. (2013): Chapter 06: Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5: a012583.
- Kunz, C., Saito, Y., Schär, P. (2009): Mismatched repair: Variations on a theme. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 1021–1038.
- Laird, P.W. (2005): Cancer epigenetics. *Human Molecular Genetics* 14: 65–76.
- Larsen, N.B., Gao, A.O., Sparks, J.L., Gallina, I., Wu, R.A., Mann, M., Räschele, M., Walter, J.C., Duxin, J.P. (2019): Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair by SPRTN and the Proteasome in *Xenopus* Egg Extracts. *Molecular Cell* 73: 574-588.e7.
- Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U., Bestor, T.H. (1992): A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71: 865–873.
- Lermontova, I., Schubert, V., Fuchs, J., Klatte, S., Macas, J., Schubert, I. (2006): Loading of *Arabidopsis* centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell* 18: 2443–2451.
- Lin, C.P., Ban, Y., Lyu, Y.L., Desai, S.D., Liu, L.F. (2008): A ubiquitin-proteasome pathway for the repair of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Journal of Biological Chemistry* 283: 21074–21083.

- 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.
- 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*. *Plant Cell* 27: 1788–1800.
- Liu, L.F., Duann, P., Lin, C.T., D’Arpa, P., Wu, J. (1996): Mechanism of action of camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 803: 44–49.
- Losada, A., Hirano, T. (2005): Dynamic molecular linkers of the genome: The first decade of SMC proteins. *Genes and Development* 19: 1269–1287.
- 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*. *Plant Cell* 22: 3318–3330.
- Manova, V., Gruszka, D. (2015): DNA damage and repair in plants – From models to crops. *Frontiers in Plant Science* 6: 1–26.
- McCarthy, M.M., Rissman, E.F. (2015): Epigenetics of Reproduction. In Knobil and Neill’s *Physiology of Reproduction: Two-Volume Set* p.Fourth Edi. Elsevier.
- Minko, I.G., Kurtz, A.J., Croteau, D.L., Van Houten, B., Harris, T.M., Lloyd, R.S. (2005): Initiation of repair of DNA - Polypeptide cross-links by the UvrABC nuclease. *Biochemistry* 44: 3000–3009.
- Moldovan, G.-L., D’Andrea, A.D. (2009): How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annual Review of Genetics* 43: 223–249.
- Montecucco, A., Zanetta, F., Biamonti, G. (2015): Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI Journal* 14: 95–108.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Nakano, T., Katafuchi, A., Matsubara, M., Terato, H., Tsuboi, T., Masuda, T., Tatsumoto, T., Pil Pack, S., Makino, K., Croteau, D.L., Van Houten, B., Iijima, K., Tauchi, H., Ide, H. (2009): Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 284: 27065–27076.
- Nakano, T., Morishita, S., Katafuchi, A., Matsubara, M., Horikawa, Y., Terato, H., Salem, A.M.H., Izumi, S., Pack, S.P., Makino, K., Ide, H. (2007): Nucleotide Excision Repair and Homologous Recombination Systems Commit Differentially to the Repair of DNA-Protein Crosslinks. *Molecular Cell* 28: 147–158.
- Noll, D.M., McGregor Mason, T., Miller, P.S. (2006): Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical Reviews* 106: 277–301.
- 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.
- Orta, M.L., Calderón-Montaña, J.M., Domínguez, I., Pastor, N., Burgos-Morón, E., López-Lázaro, M., Cortés, F., Mateos, S., Helleday, T. (2013): 5-Aza-2'-deoxycytidine causes replication lesions that require Fanconi anemia-dependent homologous recombination for repair. *Nucleic Acids Research* 41: 5827–5836.

- Ovečka, M., Lang, I., Baluška, F., Ismail, A., Illeš, P., Lichtscheidl, I.K. (2005): Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma* 226: 39–54.
- De Piccoli, G., Torres-Rosell, J., Aragón, L. (2009): The unnamed complex: What do we know about Smc5-Smc6? *Chromosome Research* 17: 251–263.
- Plo, I., Liao, Z.Y., Barceló, J.M., Kohlhagen, G., Caldecott, K.W., Weinfeld, M., Pommier, Y. (2003): Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA Repair* 2: 1087–1100.
- Pommier, Y., Barcelo, J.M., Rao, V.A., Sordet, O., Jobson, A.G., Thibaut, L., Miao, Z.H., Seiler, J.A., Zhang, H., Marchand, C., Agama, K., Nitiss, J.L., Redon, C. (2006): Repair of Topoisomerase I-Mediated DNA Damage. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 81: 179–229.
- Pouliot, J.J., Yao, K.C., Robertson, C.A., Nash, H.A. (1999): Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science* 286: 552–555.
- 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. Elsevier B.V.
- Qu, L.J., Qin, G. (2014): Flow cytometry - Arabidopsis Protocols. *Methods in Molecular Biology* 1062: 225–239.
- Regairaz, M., Zhang, Y.W., Fu, H., Agama, K.K., Tata, N., Agrawal, S., Aladjem, M.I., Pommier, Y. (2011): Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *Journal of Cell Biology* 195: 739–749.
- Remington, S.J. (2011): Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Science* 20: 1509–1519.
- Sabourin, M., Nitiss, J.L., Nitiss, K.C., Tatebayashi, K., Ikeda, H., Osheroff, N. (2003): Yeast recombination pathways triggered by topoisomerase II-mediated DNA breaks. *Nucleic Acids Research* 31: 4373–4384.
- Santi, D. V., Norment, A., Garrett, C.E. (1984): Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 6993–6997.
- 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.
- Schermelleh, L., Haemmer, A., Spada, F., Rösing, N., Meilinger, D., Rothbauer, U., Cardoso, C.M., Leonhardt, H. (2007): Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Research* 35: 4301–4312.
- Serbyn, N., Noireterre, A., Bagdiul, I., Plank, M., Michel, A.H., Loewith, R., Kornmann, B., Stutz, F. (2020): The Aspartic Protease Ddi1 Contributes to DNA-Protein Crosslink Repair in Yeast. *Molecular Cell* 77: 1066-1079.e9.
- Singh, B.N., Sopory, S.K., Reddy, M.K. (2004): Plant DNA topoisomerases: Structure, function, and cellular roles in plant development. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23: 251–269.
- 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. Elsevier Inc.
- Stingele, J., Bellelli, R., Boulton, S.J. (2017): Mechanisms of DNA-protein crosslink repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18: 563–573. Nature Publishing Group.

- Stingele, J., Habermann, B., Jentsch, S. (2015): DNA-protein crosslink repair: Proteases as DNA repair enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 40: 67–71. Elsevier Ltd.
- 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. Elsevier Inc.
- Tretyakova, N.Y., Groehler, A., Ji, S. (2015): DNA-Protein Cross-Links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes. *Accounts of Chemical Research* 48: 1631–1644.
- Uhlmann, F. (2016): SMC complexes: From DNA to chromosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17: 399–412. Nature Publishing Group.
- Vare, D., Groth, P., Carlsson, R., Johansson, F., Erixon, K., Jenssen, D. (2012): DNA interstrand crosslinks induce a potent replication block followed by formation and repair of double strand breaks in intact mammalian cells. *DNA Repair* 11: 976–985. Elsevier B.V.
- Vaz, B., Popovic, M., Ramadan, K. (2017): DNA–Protein Crosslink Proteolysis Repair. *Trends in Biochemical Sciences* 42: 483–495. Elsevier Ltd.
- Vermeulen, W., Fousteri, M. (2013): Mammalian transcription-coupled excision repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: 1–16.
- Vonarx, E.J., Mitchell, H.L., Karthikeyan, R., Chatterjee, I., Kunz, B.A. (1998): DNA repair in higher plants. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 400: 187–200.
- Wood, R.D. (1999): DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* 81: 39–44.
- Wu, J.C., Stubbe, J.A., Kozarich, J.W. (1985): Mechanism of Bleomycin: Evidence for 4'-Ketone Formation in Poly(dA-dU) Associated Exclusively with Free Base Release†. *Biochemistry* 24: 7569–7573.
- Yokoyama, R., Hirakawa, T., Hayashi, S., Sakamoto, T., Matsunaga, S. (2016): Dynamics of plant DNA replication based on PCNA visualization. *Scientific Reports* 6: 1–9. Nature Publishing Group.
- Zagnoli-Vieira, G., Caldecott, K.W. (2017): TDP2, TOP2, and SUMO: What is ZATT about? *Cell Research* 27: 1405–1406. Nature Publishing Group.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 286: 403–409.
- Zeng, Z., Sharma, A., Ju, L., Murai, J., Umans, L., Vermeire, L., Pommier, Y., Takeda, S., Huylebroeck, D., Caldecott, K.W., El-Khamisy, S.F. (2012): TDP2 promotes repair of topoisomerase I-mediated DNA damage in the absence of TDP1. *Nucleic Acids Research* 40: 8371–8380.