

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2023**

**Michal Steiger**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Genetická analýza zapojení kandidátních proteinů  
do opravných drah poškození DNA**

**Bakalářská práce**

**Michal Steiger**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2023**

**Vedoucí práce: Jovanka Vladejić M.Sc.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michal STEIGER**  
Osobní číslo: **R20725**  
Studijní program: **B1501 Biologie**  
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Genetická analýza zapojení kandidátních proteinů do opravných drah poškození DNA**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

1. Literární rešerše a teoretický úvod do tématu
2. Izolace nukleových kyselin
3. PCR amplifikace, gelová elektroforéza a purifikace PCR produktů
4. Selektce rostlin citlivých ke genotoxickým látkám
5. Příprava vzorků a fluorescenční mikroskopie
6. Analýza dat

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Díaz, M., Pečinková, P., Nowicka, A., Baroux, C., Sakamoto, T., Gandha, P. Y., ... & Pečinka, A. (2019). The SMC5/6 complex subunit NSE4A is involved in DNA damage repair and seed development. *The Plant Cell*, 31(7), 1579-1597.
2. Ricaud, L., Proux, C., Renou, J. P., Pichon, O., Fochesato, S., Ortet, P., & Montané, M. H. (2007). ATM-mediated transcriptional and developmental responses to  $\gamma$ -rays in *Arabidopsis*. *PLoS one*, 2(5), e430.
3. Yoshiyama, K. O. (2015). SOG1: a master regulator of the DNA damage response in plants. *Genes & Genetic Systems*, 15-00011.

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Jovanka Vladejíc**

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 28. března 2022  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 30. března 2022

## BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení autora	Michal Steiger
Název práce	Genetická analýza zapojení kandidátních proteinů do opravných drah poškození DNA
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Jovanka Vladejić M.Sc.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Opravné dráhy poškození DNA jsou nezbytné pro udržení stability genomu organismů. I přes významný pokrok učiněný v pochopení fungování zmíněných drah zůstává mnoho proteinů zapojených do těchto procesů neidentifikovaných. Tato práce měla za cíl přispět k porozumění mechanismů opravných drah DNA studiem zapojení sedmi kandidátních proteinů u huseníčku rolního (<i>Arabidopsis thaliana</i>). Semena linií huseníčku s homozygotní mutací v genu kódujícím daný protein byla podrobena testům s genotoxickými látkami, které vyvolávaly různé formy poškození DNA. Proteiny XYL1 a STUBL5 byly vyloučeny ze zapojení se do opravných drah. Heterozygotní linie BIC2-1/<i>bic2-1</i> a STUBL5-1/<i>stubl5-1</i> potenciálně obsahují další neidentifikovanou mutaci, což je potřeba potvrdit či vyvrátit v budoucích testech.</p>
Klíčová slova	<i>Arabidopsis thaliana</i> , BCP1, oprava DNA
Počet stran	46
Počet příloh	1
Jazyk	Český

## **BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION**

Author's first name and surname	Michal Steiger
Title	Genetic analysis of the candidate proteins' involvement in DNA damage repair pathways
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Jovanka Vladejić M.Sc.
The year of presentation	2023

### Abstract

DNA damage repair pathways are essential for maintaining genome stability in organisms. Despite significant progress made in understanding the functioning of these pathways, many proteins involved in these processes remain unidentified. This thesis aimed to contribute to the understanding of DNA repair mechanisms by studying the involvement of seven candidate proteins in *Arabidopsis thaliana*. Seeds of *Arabidopsis* lines with homozygous mutations in the gene encoding the candidate protein were subjected to tests with genotoxic chemicals which induced various forms of DNA damage. Proteins XYL1 and STUBL5 were excluded from involvement in DNA repair pathways. Heterozygous lines BIC2-1/*bic2-1* and STUBL5-1/*stubl5-1* potentially bear additional unidentified mutations which needs to be confirmed or refuted in future tests.

Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , BCP1, DNA repair
Number of pages	46
Number of appendices	1
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracoval samostatně pod vedením Jovanky Vladejíc M.Sc. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne .....

.....

Michal Steiger

Rád bych poděkoval své vedoucí Jovance Vlodejić M.Sc. za trpělivost a čas, který mi věnovala při zasvěcování do praktické i teoretické problematiky studia oprav DNA u rostlin. Můj dík patří i pracovnímu kolektivu Ústavu experimentální botaniky za vytvoření příjemné atmosféry pro studenty.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky v rámci projektu 22-00871S.



# OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1	Poškození DNA rostlin.....	3
3.2	Následky aktivace DDR.....	4
3.2.1	Hlavní způsoby oprav DNA.....	4
3.2.2	Zastavení buněčného cyklu.....	5
3.2.3	Endoreduplikace.....	5
3.2.4	Programovaná buněčná smrt.....	6
3.3	Signální dráha DDR.....	6
3.3.1	Transduktory – kinázy ATM a ATR.....	6
3.3.2	Hlavní regulátor – SOG1.....	8
3.3.3	Mediátory.....	10
3.3.4	SMC5/6.....	12
4	MATERIÁL A METODY.....	15
4.1	Biologický materiál.....	15
4.2	Použité chemikálie a roztoky.....	17
4.2.1	Použité chemikálie.....	17
4.2.2	Použité roztoky a jejich příprava.....	18
4.2.3	Použité primery.....	19
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	22
4.3.1	Přístroje a zařízení.....	22
4.3.2	Programy.....	23
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	23
4.4.1	Sterilizace povrchu semen – suchá.....	23
4.4.2	Selekce mutantních rostlin.....	23
4.4.3	Extrakce genomické DNA.....	24

4.4.4	Genotypizace.....	25
4.4.5	Pěstování rostlin a sběr semen .....	26
4.4.6	Sterilizace povrchu semen .....	27
4.4.7	Eseje citlivosti vůči poškození DNA.....	27
4.4.8	Hodnocení semen .....	28
4.4.9	Testy somatických fenotypů .....	28
5	VÝSLEDKY .....	29
5.1	Selekce mutantních rostlin.....	29
5.2	Eseje citlivosti vůči poškození DNA.....	30
5.3	Hodnocení semen .....	32
5.4	Somatický fenotyp.....	34
6	DISKUSE.....	35
7	ZÁVĚR.....	37
8	LITERATURA.....	38
9	PŘÍLOHY .....	46

## SEZNAM ZKRATEK

ANOVA	analysis of variance, analýza rozptylu
ATM	ataxia telangiectasia mutated (kináza)
ATR	ATM- and RAD3-related (kináza)
BER	base excision repair, oprava excizí báze
BRCT	BRCA1 C-terminal (doména)
CDKs	cyklin-dependentní kinázy
cNHEJ	kanonické NHEJ
CPD	cyklobutanové pyrimidinové dimery
DDR	DNA damage response, odpověď na poškození DNA
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DNA-PK	DNA dependentní protein kináza
DNA-PKcs	katalytické podjednotky DNA-dependentní protein kinázy
dNTPs	β,D,2'-deoxyribonukleosidtrifosfáty
DSB	double strands breaks, dvouvláknové zlomy (DNA)
F	forward primer
FHA	forkhead associated (doména)
GUS	β-glukuronidáza
HR	homologní rekombinace
ICRF-187	dexrazoxan
IR	ionizing radiation, ionizující záření
MMC	mitomycin C
MMR	mismatch repair
MMS	methylmethansulfonát
NAC	NAM, ATAF1/2, CUC2 (doména)
NER	nucleotide excision repair, oprava excizí nukleotidů

NHEJ	non-homologous end joining, nehomologní spojení konců
NSE	NON-SMC element
PCD	programmed cell death, programovaná buněčná smrt
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PI3Ks	phosphatidylinositol 3-kinases, fosfatidylinositol-3-kinázy
PIKKs	phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases, kinázy příbuzné s fosfatidylinositol-3-kinázami
R	reverse primer
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
SMCs	structural maintenance of chromosomes, proteiny strukturní údržby chromozomů
SOG1	Suppressor of gamma response 1
SSB	single strand breaks, jednovláknové zlomy (DNA)
SUMO	small ubiquitin-like modifier
UV	ultrafialové záření
UVB	ultrafialové záření B
WT	wild-type, organismus s nemutovanou formou určitého genu či genů
ZEB	zebularin
ZEO	zeocin

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1:** Dráhy odpovědi na poškození DNA u rostlin a jejich biologické vyústění. SOG1 je vyobrazen jako centrální regulační faktor, který zprostředkovává DDR. Převzato od Yoshiyama a kol., 2013b.....9
- Obr. 2:** Horní elektroforetogram: čísla 2 a 3 značí signály amplikonů pro homozygotní jedince *pans1-1*. Dolní elektroforetogram: čísla 1 a 2 značí signály amplikonů pro heterozygotní jedince *STUBL5-1/stubl5-1*. M – DNA marker relativní molekulové hmotnosti. NTC – kontrola bez templátu (no template control). WT – negativní kontrola pomocí linie WT.....29
- Obr. 3:** Délka kořenů WT a mutantních rostlin rostoucích v kontrolních podmínkách (Mock). Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku mezi průměry 3 biologických replikátů. Stejně písmeno značí vzorky, které se významně nelišily v jednocestné ANOVA s posthoc Tukeyho testem ( $P < 0,05$ ). .....31
- Obr. 4:** Relativní délka kořenů WT a mutantních rostlin vůči délce kořenů na Mock. Rostliny rostly v podmínkách s genotoxickou látkou. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku mezi průměry 3 biologických replikátů. Stejně písmeno značí vzorky, které se významně nelišily v jednocestné ANOVA s posthoc Tukeyho testem ( $P < 0,05$ ). .....31
- Obr. 5:** Fenotyp semen rostlin wild-type (WT), heterozygota *BIC2-1/bic2-1* a heterozygota *STUBL5-2/stubl5-2*. Hvězda značí abortovaná vajíčka. Šipka značí abortovaná semena. Bílé měřítko značí 3 mm. ....32
- Obr. 6:** Somatické fenotypy mutantů v porovnání s WT. Růst probíhal v substrátu v růstové komoře a fotografie byla pořízena 4 týdny po vysetí. Bílé měřítko odpovídá 1 cm. ....34

## SEZNAM TABULEK

<b>Tab. 1:</b> Použité linie huseníčku rolního ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) a jejich charakteristika.....	16
<b>Tab. 2:</b> Růstové podmínky huseníčku rolního ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) v různých prostředích. .....	17
<b>Tab. 3:</b> Charakteristika a přehled primerů použitých při genotypizaci nemutovaných alel zkoumaných genů.....	20
<b>Tab. 4:</b> Charakteristika a přehled primerů použitých při genotypizaci mutovaných alel zkoumaných genů.....	21
<b>Tab. 5:</b> Vektory a geny rezistence přítomné v daných genech mutantních linií a herbicidy použité k jejich selekci.....	24
<b>Tab. 6:</b> Složky reakční směsi PCR o celkovém objemu 20 µl.....	26
<b>Tab. 7:</b> Teplotní program pro PCR.....	26
<b>Tab. 8:</b> Hodnocení stavu a zastoupení semen u heterozygotních linií BIC2-1/ <i>bic2-1</i> a STUBL5-1/ <i>stubl5-1</i> v porovnání s WT. ....	33

# 1 ÚVOD

Rostlinný genom je neustále zatěžován řadou vnějších i vnitřních faktorů, které ovlivňují jeho stabilitu. Aby byla zachována celistvost genomu, využívají rostliny spletité signální dráhy nazývané jako odpověď na poškození DNA. Tyto dráhy jsou založeny na rozpoznání poškození, přenosu signálu a konečné odpovědi.

Interakce v těchto drahách se uskutečňují přes řadu proteinů, z nichž mnoho dosud nebylo identifikováno. Porozumění molekulárním mechanismům a regulačním drahám odpovědi na poškození DNA u rostlin napomůže vývoji strategiím, které povedou ke zlepšení odolnosti a produktivity plodin, jež se potýkají s výzvami měnícího se životního prostředí.

## **2 CÍLE PRÁCE**

Literární rešerše a teoretický úvod do tématu.

Izolace nukleových kyselin.

PCR amplifikace, gelová elektroforéza a purifikace PCR produktů.

Selekce rostlin citlivých ke genotoxickým látkám.

Příprava vzorků a fluorescenční mikroskopie.

Analýza dat.



### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Poškození DNA rostlin

Rostliny jsou organismy neschopné aktivního přemísťování. Pokud na ně tedy jejich prostředí působí stresy, způsobenými abiotickými či biotickými činiteli, nemohou před nimi rostliny bezprostředně uniknout. Tyto stresy mohou vyvolat poškození DNA, na něž rostlina reaguje spuštěním signálních drah odpovědi na poškození DNA (tzv. DNA damage response, DDR). DDR může vést k aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu a jeho zastavení, opravám DNA, buněčné smrti či endoreduplikaci. To vše se děje, aby byla zabezpečena integrita genomu (Yoshiyama a kol., 2013b; Yoshiyama, 2015).

Abiotickými stresy se rozumí faktory jako extrémní teploty, nedostatek či nadbytek vody, ionizující i neionizující záření, toxické koncentrace kovů, genotoxické chemikálie (Tuteja a kol., 2011). Příklad poškození ionizujícím zářením je UV záření. Pokud dojde k DNA poškození způsobeným tímto zářením, dochází ve většině případů ke vzniku cyklobutanových pyrimidinových dimerů (CPD), jež blokují transkripci a replikaci DNA. U huseníčku mohou být tato poškození opravena fotolyázami anebo excizí nukleotidů (nucleotide excision repair, NER) (Britt, 2004). Kovy, ke kterým náleží kadmium, olovo, rtuť, měď i hliník, též přispívají k abiotickým stresům. Těžké kovy jako kadmium, rtuť a olovo nemají žádnou známou funkci, kterou by se podílely na růstu a vývoji rostlin. Na druhou stranu zinek a měď jsou pro správné fungování rostlin nezbytné, avšak jejich vysoké koncentrace jsou toxické. Toxické vlivy způsobené kovy se různí; mohou zasahovat do průběhu fotosyntézy, bránit absorpci esenciálních kovů či poškozovat DNA. Škody na DNA mohou takto vznikat buď přímo, anebo nepřímo pomocí tvorby reaktivních forem kyslíku (Küpper a Andresen, 2016). K abiotickým stresům můžeme zařadit i různé chemikálie. Ve výzkumu se používá celá řada látek, které vyvolávají nejrůznější druhy poškození DNA či s ní jinak interferují. Díky tomu lze zkoumat efekty těchto poškození na dynamiku (nejen) rostlinného genomu. Za zmínku stojí například zeocin a bleocin, které přes zvýšenou tvorbu volných radikálů vyvolávají jednovláknové (single strand breaks, SSB) a dvouvláknové zlomy DNA (double strand breaks, DSB). Mezivláknové kovalentní spoje (crosslinky) DNA vyvolává mitomycin C (MMC) či cisplatina. Ethylmethansulfonát a methylmethansulfonát navozují tranzici a transverzi dusíkatých bází DNA. Analogy cytidinu zebularin a 5-azacytidin snižují metylaci DNA. Zebularin zároveň indukuje tvorbu DNA-proteinových crosslinků (Pečinka a Liu, 2014; Procházková a kol., 2022).

Rostlinní škůdci a patogeny spadají do kategorie biotických stresů. Takovým škůdcem může být fytofágní hmyz, hlístice či roztoči. Patogeny jsou houby, bakterie a viry (Diaz, 2018). Co mají abiotické, biotické i další stresové faktory obecně společného, je to, že zpravidla vedou ke zvýšené tvorbě ROS (reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku) (Sharma a kol., 2012).

Na abiotické a biotické stresové faktory můžeme pohlížet jako na činitele, kteří vyvolávají poškození DNA u rostlin exogenně. Ovšem poškození DNA vzniká i bez účasti exogenních faktorů, a to vlivem endogenních faktorů. Jeden ze zdrojů endogenního poškození je samotný metabolismus buňky, v rámci kterého vznikají volné radikály. Významnou skupinou volných radikálů jsou reaktivní formy kyslíku, kam zahrnujeme iont superoxidu  $O_2^-$ , hydroxylový radikál  $OH^\bullet$ , peroxid vodíku  $H_2O_2$  či singletový kyslík  $^1O_2$  (Sharma a kol., 2012). ROS přirozeně vznikají v metabolických drahách, při kterých jsou transportovány elektrony. Tyto dráhy se nacházejí v chloroplastech, mitochondriích, plazmatické membráně a dalších buněčných kompartmentech (Sharma a kol., 2012; Heyno a kol., 2011). ROS například způsobují oxidativní poškození dusíkatých bází. To má za následek vznik jejich derivátů, které mohou zapříčinit i jejich nesprávné párování (Cadet a kol., 2010).

Kromě škod způsobených prostřednictvím ROS existují i poškození DNA, která vznikají spontánně. Těmi mohou být spontánní deaminace bází, které ovlivňují adenin, guanin a cytosin. U rostlin je deaminace 5-methylcytosinu běžným zdrojem mutací, které následně vedou ke vzniku thyminu a pozdější bodové mutaci při replikaci (Cadet a kol., 2010). Dále lze k těmto typům poškození přiřadit abazická místa. Abazická místa vznikají hydrolyzou N-glykosidické vazby mezi dusíkatou bází a deoxyribózou, či vznikají jako meziprodukt v průběhu oprav bází, které jsou deaminované, alkylované nebo oxidované (Manova a Gruszka, 2015).

Procesy spojené s DNA, jakými je replikace, rekombinace a další, nejsou bez chyb a mohou vyvolávat nejrůznější druhy poškození. Je odhadováno, že v genomu se každý den hromadí tisíce nejrůznějších poškození, proto je nutné, aby živé organismy měly vyvinutý efektivní systém oprav DNA (Lindahl a Barnes, 2000).

## **3.2 Následky aktivace DDR**

### **3.2.1 Hlavní způsoby oprav DNA**

Jeden ze způsobů oprav DNA jsou excizní opravy. Oprava excizí báze (base excision repair, BER) spočívá jednoduše v odstranění báze, která je poškozena či jinak modifikována. Těchto oprav se účastní DNA glykosylázy, které štěpí N-glykosidickou vazbu. Nevyhnutelnou

součástí těchto akcí je vznik abazických míst, které mohou spustit další mechanismy oprav, jakými jsou opravy excizí nukleotidu (nucleotide excision repair, NER) či opravy rekombinací. NER odstraňuje různorodá poškození DNA. Mezi ta patří poškození vyvolaná UV a jiná poškození, která výrazně mění konformace DNA (Manova a Gruszka, 2015). Nesprávně zařazené nukleotidy opravuje tzv. mismatch repair (MMR). MMR zejména opravuje chyby způsobené nesprávnou inzercí/deleci nukleotidu během replikace.

Dvouvláknové zlomy DNA (DSB) lze opravit několika mechanismy, a to homologní rekombinací (HR) či nehomologním spojením konců (non-homologous end joining, NHEJ). HR se uplatňuje hlavně během S a G2 fáze buněčného cyklu. Poškozená DNA je v tomto mechanismu opravena podle neporušené homologní předlohy (Puchta, 2005). Kanonické NHEJ je započato rozpoznáním DSB. Toho se účastní heterodimer Ku70/Ku80, který vytváří prstencovitou strukturu okolo obou zlomů DNA. Tímto zamezuje jejich degradaci a zároveň je přivádí k sobě. Dalšími respondenty jsou kinázy DNA-PKcs, což jsou katalytické podjednotky DNA-dependentní protein kinázy. Ku70/Ku80 tvoří společně s DNA-PKcs holoenzym DNA-PK, který dále kontroluje interakce mezi DSB v průběhu cNHEJ (Manova a Gruszka, 2015).

Za zmínku stojí i fotoreaktivace. Tento způsob opravy využívá enzym fotolyáza a pomocí energie ze světla opravuje fotoprodukty CPD a 6-4 fotoprodukty (Britt, 2004).

### **3.2.2 Zastavení buněčného cyklu**

Zastavení buněčného cyklu je dočasné nebo trvalé přerušení postupu buňky buněčným cyklem. K zastavení buněčného cyklu dochází v jeho kontrolních bodech, kterými jsou G1/S a G2/M. K zastavení dochází inhibicí heterodimerů, které vznikají z cyklin-dependentních kináz (CDKs) a cyklinů. Aktivátory těchto procesů jsou kinázy ATM (primárně reaguje na DSB) a ATR (primárně reaguje na SSB a zastavení replikační vidlice). U savců při DNA poškození fosforyluje kináza ATM kinázu Chk2, čímž dojde ke stabilizaci proteinu p53. Ten aktivuje expresi proteinu p21, který působí jako inhibitor CDK a buněčný cyklus se zastavuje v bodě G1/S. ATR fosforyluje kinázu Chk1; ta společně s Chk2 fosforyluje fosfatázu Cdc25, což vyústí v zastavení buněčného cyklu v G2/M bodě (Takahashi a kol., 2019).

### **3.2.3 Endoreduplikace**

Endoreduplikace je proces, při kterém buňky v interfázi podstoupí zdvojení chromozomů bez následného mitotického dělení, což zvyšuje úroveň plodie. Na výzkumech *Arabidopsis* ve studii od Adachiho a kol. (2011) bylo zjištěno, že buňky vzrostných vrcholů kořene a kališních lístků podstupují endoreduplikaci po vystavení látkám indukujících DSB, a to za účasti SOG1, ATM a ATR. Pro vyvolání DSB byl použit zeocin, který funguje jako

radiomimetikum (napodobuje efekty vyvolané ionizujícím zářením). Pozorována byla endoreduplikace u mutantů *atm* i *atr*, ale byla výrazně potlačena u dvojitých mutantů *atm atr* i u mutantu *sog1*. Výzkumníci dospěli k závěru, že signální dráhy ATM-SOG1 a ATR-SOG1 obě přenášejí signál o DSB.

### 3.2.4 Programovaná buněčná smrt

Výzkumy *Arabidopsis* od Furukawy a kol (2010) ukázaly, že SOG1, ATM a ATR se účastní programované buněčné smrti (programmed cell death, PCD) vyvolané u rostlin ozářených UVB a gama radiací. U mutantů *sog1* došlo po ozáření UVB a IR k potlačení PCD. Zajímavým úkazem bylo, že se u *atm* mutantů vyskytoval větší počet PCD indukované pomocí UVB. To nasvědčovalo tomu, že ATM se účastní zachování integrity genomu po ozáření UVB, i když je tato kináza obvykle spojována s odpověďmi na DSB. Dalším překvapivým poznatkem byl výrazně nižší výskyt PCD vyvolané pomocí UVB v meristémech kořene u dvojitých mutantů *atm atr* v porovnání s wild-type. Což naznačuje nutnou přítomnost aspoň jedné z kináz ATM či ATR, aby mohlo dojít k PCD vyvolané UVB. U *atm* mutantů ozářených gama radiací, která vyvolává převážně DSB, bylo hypotetizováno, že by mohlo dojít ke snížení PCD. Avšak bylo zjištěno, že došlo ke zpoždění výskytu PCD, nikoli však k jeho snížení. Tedy zpožděný výskyt PCD u *atm* mutantů se zdá být závislý na ATR. Autoři této studie přicházejí s poznáním, že PCD vyvolaná pomocí UVB a IR může být spuštěna kinázami ATM anebo ATR, přičemž v žádném z těchto případů je zapotřebí obou kináz zároveň. Avšak výzkumníci Fulcher a Sablowski ve své studii z roku 2009 dospěli k závěru, že k PCD vyvolané radiomimetikem zeocin (to vyvolává DSB) je zapotřebí jak ATM tak i ATR. Tento závěr mohl být však zkreslen limitovaným počtem časových okamžiků, které byly studovány, a výskyt PCD u *atm* či *atr* mutantů mohl být oddálen.

## 3.3 Signální dráha DDR

### 3.3.1 Transduktory – kinázy ATM a ATR

DDR je složitý signální systém, který usměrňuje buněčnou odpověď pro zachování integrity genomu. Tento systém závisí na kaskádě signálů, které se manifestují ve formě fosforylace proteinů pomocí serin/threonin kináz, jakými jsou rodina kináz příbuzných s fosfatidylinositol-3-kinázami (phosphatidylinositol-3 kinase-related kinases, PIKKs) a efektorové kinázy kontrolních bodů. Mezi PIKKs náleží kinázy ATM, ATR a DNA-PK. Ty mají C-koncovou konzervovanou doménu společnou s fosfatidylinositol-3-kinázami (PI3Ks), které upřednostňují fosforylaci proteinů v místě, kde aminokyselinu serin/threonin následuje glutamin (SQ/TQ místa). K efektorovým kinázám kontrolních bodů patří Chk1,

Chk2, MK2. Ty jsou bazofilní kinázy, které preferují fosforylaci proteinů obsahujících XRXXS motivy, kde X značí jakoukoli aminokyselinu, R je arginin a S je serin. (Leung a Glover, 2011; Abraham, 2001; Mohammad a Yaffe, 2009; Lempiäinen a Halazonetis, 2009).

Fosforylované proteiny jsou dále rozeznávány proteiny s doménami BRCT (BRCA1 C-terminal), doménami FHA (forkhead associated) a doménami 14-3-3. Proteiny s doménou 14-3-3 se přednostně vážou na substráty fosforylované kinázami kontrolních bodů buněčného cyklu. Proteiny s doménami BRCT a FHA na druhou stranu vážou fosforylované substráty kináz ATM a ATR (Mohammad a Yaffe, 2009)

ATM (ataxia telangiectasia mutated) a ATR (ATM- and RAD3-related) jsou hlavními regulátory odpovědi na poškození DNA u eukaryotických organismů. Proteiny, které slouží jako senzory SSB a DSB, předávají signál transduktorům ATM/ATR. Efektory těchto dvou kináz hrají zásadní roli v řadě buněčných procesů, které jsou nezbytné pro zachování integrity genomu. Jeden z typických substrátů ATM u zvířat je Chk2 a u ATR je jím Chk1. Tyto proteiny dále interagují například s BRCA1, p53 či CDC25A. Homology Chk1 a Chk2 nebyly u *Arabidopsis* nalezeny (Maréchal a Zou, 2013; Yoshiyama a kol., 2013a)

U ATM kinázy nalezneme doménu FAT (FRAP, ATM, TRRAP), která je u PI3K méně konzervovaná. Na samotném C-konci se nachází konzervovaný motiv FATC (FRAP, ATM, TRRAP, C terminus) (Bosotti a kol., 2000). Pro aktivaci ATM je zapotřebí komplex MRN (Mre11, Rad50, Nbs1), který slouží jako senzor DSB a poté na toto místo navede ATM (Lee a Paull, 2005). Aktivovaná ATM iniciuje řadu DDR událostí na chromatinu sousedícím s detekovaným DSB. Zásadní událostí je fosforylace histonové varianty H2AX (Savic a kol., 2009). Fosforylovaná varianta H2AX se označuje jako  $\gamma$ -H2AX. Typická vlastnost fosforylace histonové varianty H2AX je, že k ní nedochází jen v bezprostřední blízkosti zlomu DNA, ale fosforylován je větší úsek obklopující tento zlom. Oblasti chromatinu s  $\gamma$ -H2AX se označují jako ložiska (anglicky foci) (Rogakou a kol., 1998). Bylo zjištěno, že u *Arabidopsis* je při ozáření pomocí IR za tvorbu  $\gamma$ -H2AX ložisek přímo či nepřímo zodpovědná ATM (kolem 90 %). U *atm* mutantů dochází ke vzniku  $\gamma$ -H2AX ložisek v nízkém počtu; u *atm atr* dvojitých mutantů pak nevznikají vůbec. K fosforylaci histonové varianty H2AX dochází v závislosti jak na ATM tak i na ATR. Rovněž se zdá, že u rostlin IR vyvolává menší poškození genomu v porovnání se savci a houbami, anebo rostliny tvoří méně  $\gamma$ -H2AX ložisek (Friesner a kol., 2005). Přes ATM kinázu se dále zprostředkovávají kontrolní body buněčného cyklu, opravy pomocí HR a NHEJ (Ricaud a kol., 2007).

ATR je aktivována přítomností SSB, DSB i zastavením replikační vidlice. Při výskytu SSB dojde k navázání replikačního proteinu A (RPA) na DNA. Na něj se váže ATR pomocí ATR interagujícího proteinu (ATRIP). Aktivace ATR vyžaduje ještě přítomnost komplexu 9-1-1 (Rad9, Rad1, Hus1), který je na poškozenou DNA naložen pomocí Rad17 replikačního faktoru C (Sweeney a kol., 2009; Heitzeberg a kol., 2004). Zaktivovaná ATR kináza blokuje replikaci a fosforyluje další substráty, což vede k pozastavení buněčného cyklu. (Ricaud a kol., 2007).

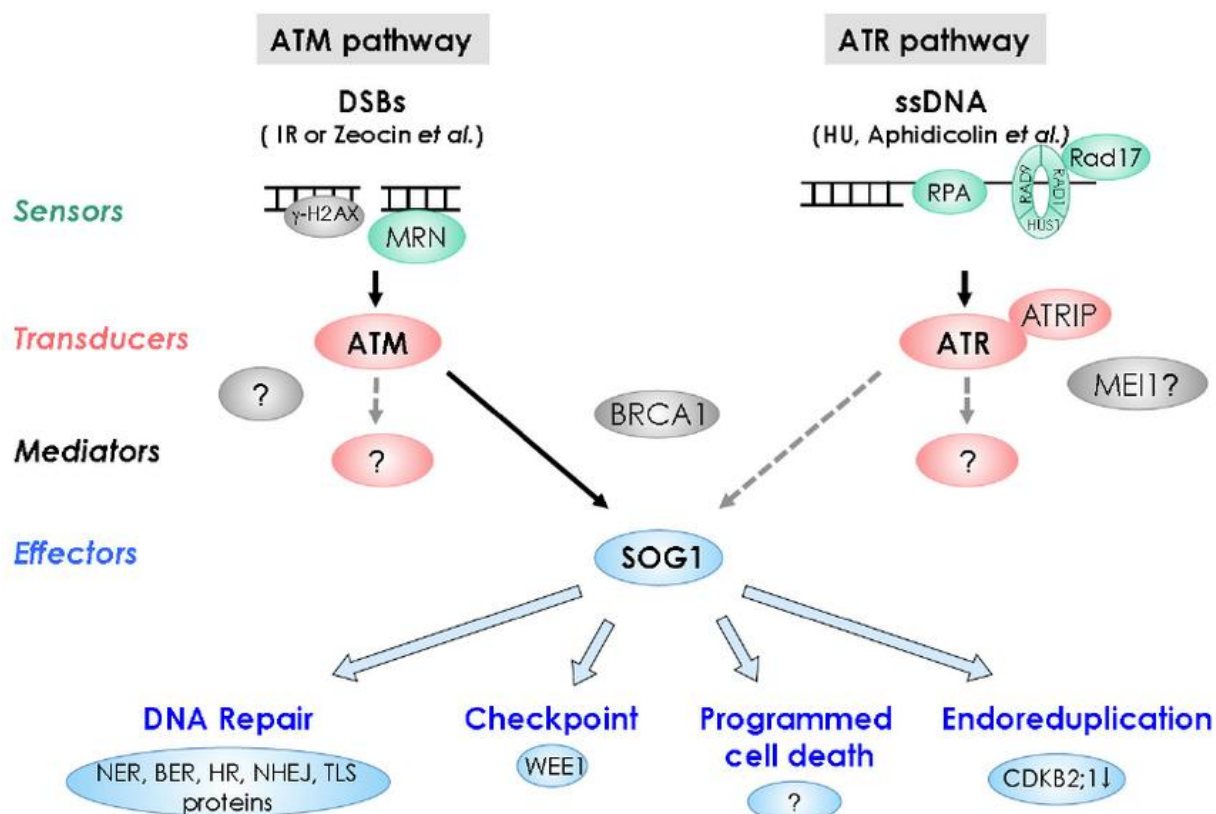
Co se týče fenotypu, *atm* mutanti *Arabidopsis thaliana* jsou k nerozeznání od wild-type jedinců, ale jsou částečně sterilní. *atr* mutanti *A. thaliana* jsou plně fertillní a životaschopní (Garcia a kol., 2003; Culligan a kol., 2004). Na základě těchto rozdílů ve fenotypu u rostlin a zvířat lze usoudit, že role ATM a ATR u rostlin jsou specifické a liší se od zvířat. (Yoshiyama, 2015).

### 3.3.2 Hlavní regulátor – SOG1

Řada proteinů zastávajících roli transduktorů a efektorů při DDR, jako jsou ATM a ATR, je konzervovaná napříč eukaryotickou doménou. Zajímavé ovšem je, že se tohle nedá říct o transkripčních faktorech účastnících se DDR, které signál přenášejí k dalším regulátorům. U zvířat je znám protein p53, který funguje jako nepostradatelný transkripční faktor řídící různé aspekty buněčné reakce na poškození. Rostliny postrádají ortholog proteinu p53, který by byl podobný svou aminokyselinovou sekvencí. Avšak právě SOG1 byl popsán jako jeho funkční analog, jenž je jedinečný pro rostliny (Obr. 1). Rostliny tedy obdobně jako zvířata využívají centrální regulační transkripční faktor k řízení toku informací souvisejících s jejich reakcí na poškození (Yoshiyama a kol., 2009).

Rostliny *A. thaliana* s mutací v genu Suppressor of gamma response (SOG1) byly poprvé izolovány u mutantů *uvh1* (Ultraviolet hypersensitive 1). UVH1 je homolog kvasinkového proteinu Rad1 a lidského proteinu XPF a kóduje podjednotku endonukleázy, která se účastní nukleotidových excizních oprav (Liu a kol., 2000). Semena mutantů *uvh1* po vystavení gama radiaci klíčí normálně, ale buňky meristému se poté pozastaví v G2 fázi buněčného cyklu. Fenotypově je lze rozeznat tak, že semenáče vytváří pravé listy až po přibližně 17 dnech, na rozdíl od wild-type jedinců, kteří po ozáření vytváří pravé listy již po 8 až 9 dnech. Semena linie *uvh1* byla mutagenizována pomocí ethylmethansulfonátu. U potomků mutagenizované generace byli objeveni taci, kteří vytvářeli pravé listy i po ozáření gama radiací. Další výzkum těchto mutantů objevil mutaci v genu pro SOG1. Buňky jedinců s mutací

v tomto genu byly schopny překonat kontrolní bod v G2 fázi a dále pokračovat v buněčném cyklu (Preuss a Britt, 2003).



**Obr. 1:** Dráhy odpovědi na poškození DNA u rostlin a jejich biologické vyústění. SOG1 je vyobrazen jako centrální regulační faktor, který zprostředkovává DDR. Převzato od Yoshiyama a kol., 2013b.

Proteinové produkty genu SOG1 obsahují doménu NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2), která je důležitá pro schopnost vazby na DNA. Proteiny s doménou NAC spadají do jedné z největších skupin transkripčních faktorů, které jsou specifické pro rostliny. Proteiny s doménou NAC lze nalézt u mechů, plavuní, nahosemenných rostlin a u většiny krytosemenných rostlin. Tyto transkripční faktory se účastní nejrůznějších procesů, jako je růst, vývoj, buněčná odpověď na patogeny či odpověď na stresové faktory (Wang a kol. 2011; Zhu a kol., 2012). Zástupci NAC proteinové rodiny nebyli nalezeni u jednobuněčných zelených řas, což naznačuje, že SOG1 je specifický pro mnohobuněčné rostliny (Yoshiyama a kol., 2009). U *A. thaliana* bylo popsáno více než 100 proteinů s NAC doménou. Ve studii od Jensena a kol. (2010) byly proteiny s touto doménou rozděleny do 10 hlavních skupin, kde SOG1 spadl do podskupiny označené IX-1. Proteiny v této skupině se odlišovaly od ostatních skupin prodloužením na N-konci o přibližné délce 40 aminokyselin.

Histochemickým barvením pomocí GUS bylo zjištěno, že SOG1 je silně exprimován v meristematických pletivech, jakými je vzrostný vrchol kořene a stonku. Dále byla jeho exprese pozorována v cévních svazcích mladých listů a středním válci. Všechna tato pletiva

jsou součástí pletiv meristemických, došlo se tedy k závěru, že SOG1 převážně plní svou funkci v pletivech s aktivně se dělicími buňkami. SOG1 má v porovnání se svým savčím orthologem, proteinem p53, jiný mechanismus aktivace v buňkách. Koncentrace p53 je v buňkách nízká při podmínkách bez stresu (probíhá jeho stálá degradace ubikvitinací), a naopak stoupá jeho koncentrace při genotoxickém stresu. V případě SOG1 nedochází při genotoxickém stresu k výrazným změnám v jeho koncentraci. Fluorescence funkčního fúzního protein SOG1-GFP byla pozorována v buněčném jádře, nikoli však v cytoplazmě; nedocházelo ani ke změnám intenzity fluorescence při vystavení genotoxickému stresu. Dále bylo zjištěno, že aktivita SOG1 je spíše řízena posttranskripční modifikací, a to jeho fosforylací. SOG1 obsahuje na C-konci 5 kopií serinu následovaného glutaminem (SQ motiv). Tyto SQ motivy jsou upřednostňovanými místy pro fosforylaci kinázou ATM či ATR jako odpověď na DSB. (Yoshiyama a kol., 2013a; Yoshiyama, 2015).

### 3.3.3 Mediátory

Mediátory jsou proteiny přenášející signál od kináz ATM/ATR dále v rámci signální dráhy DDR. Napomáhají aktivaci faktorů nezbytných k řádnému průběhu této dráhy. Zpravidla interagují s fosforylovanými proteiny anebo jsou samy fosforylovány pomocí ATM/ATR.

14-3-3 proteiny byla první skupina proteinů, u které se objevilo, že dokážou vázat fosforylovaný serin (fosfoserin, pS) a fosforylovaný threonin (fosfothreonin, pT) (Yaffe a kol., 1997; Muslin a kol., 1996). Tyto proteiny jsou konzervované u eukaryotických organismů. Účastní se procesů řídících buněčný cyklus, regulace kináz, fosfatáz či transkripčních faktorů. Významnou rolí těchto proteinů je, že se účastní zprostředkování vstupu do kontrolních bodů buněčného cyklu G1/S a G2/M po výskytu poškození DNA. Činí tak potlačením aktivity heterodimerů CDK-cyklin, a to přes přímou vazbu a inhibici fosfatáz z rodiny Cdc25 a vazbou a aktivací kinázy Wee1. Tímto zůstává Cdk1 fosforylovaný a tím pádem neaktivní (Mohammad a Yaffe, 2009).

Určitá část mediátorů obsahuje FHA (forkhead associated) doménu, která se váže výhradně na fosfothreonin. Tyto domény byly nalezeny u stovek proteinů nacházejících se u prokaryot i eukaryot. Proteiny s touto doménou se účastní transkripce, DDR a regulace buněčného cyklu. Touto doménou disponuje např. kináza Chk2 (Mohammad a Yaffe, 2009).

Další velkou podskupinou mediátorů jsou proteiny obsahující doménu BRCT (BRCA1 C-terminal). Ta byla původně identifikována jako doména, která se běžně vyskytuje u řady proteinů zapojených do DDR (Callebaut a kol., 1997; Bork a kol., 1997). Pojmenována byla podle proteinu BRCA1 (Breast cancer 1), což je tumor-supresorový protein. Domény BRCT



se často v proteinu vyskytují tandemově v několika opakováních. Celkově vzato je ale přítomnost BRCT domén v proteinech rozmanitá. V daném proteinu se může nacházet pouze jedna tato doména, může zde být v mnohonásobných kopiích i dohromady s jinými doménami. I když ne všechny BRCT domény se vážou na fosfopeptidy, tak některé v tandemovém uskupení dávají spíše přednost vazbě na peptidy s fosfoserinem, se kterými tvoří silnější vazby než s peptidy s fosfothreoninem. Schopnost vázat se na fosfopeptid vyžaduje přítomnost dvou BRCT domén v tandemu (Manke a kol., 2003; Yu a kol., 2003; Mohammad a Yaffe, 2009; Leung a Glover, 2011).

U savců je jedním z předních činitelů účastnících se homologní rekombinace (HR) protein BRCA1. Ten svou aktivitu provádí často jako heterodimer s proteinem BARD1 (BRCA1 associated RING domain protein 1) (Wu a kol., 1996). Dalším proteinem vykonávajícím obdobnou funkci jako BRCA1 je BRCA2. Kromě HR se tyto proteiny účastní DDR, jsou zapojeny v regulaci buněčného cyklu, regulaci transkripce či duplikace centrozomu (Boulton, 2006).

Při výzkumech *Arabidopsis* byly objeveny homology proteinů BRCA1, BRCA2 i BARD1. U mutantů *brca1* nebyly pozorovány změny fenotypu v rámci vývoje. Co se týče genu BRCA2, byly u *Arabidopsis* nalezeny dva homology. Po umlčení exprese obou těchto genů pomocí RNA interference bylo zjištěno, že rostliny byly částečně sterilní. To ukazovalo na účast rostlinného BRCA2 při meióze. Somatický vývoj ovlivněn nebyl (Lafarge a Montané, 2003; Reidt a kol., 2006; Siaud a kol., 2004). Homology BRCA1 a BARD1 se nachází téměř ve všech rostlinných genomech, které byly sekvencovány. U rostlinných proteinů BRCA1 a BARD1 se navíc vyskytuje doména PHD (plant homeodomain), která se nenachází u homologů těchto proteinů v rámci zvířat. S pomocí tohoto a dalších zjištění bylo dospěno k tomu, že rostlinné BRCA1 a BARD1 nejsou orthology zvířecích BRCA1 a BARD1, nýbrž vznikly spíše ze společného předka BRCA1/BARD1. Některé specifické rysy těchto proteinů se mohou tedy různit mezi rostlinami a zvířaty, což je dělá zajímavými kandidáty pro další výzkum (Trapp a kol., 2011).

Jedním z typů BRCT domén je doména BRCT5. Ta byla nalezena například u lidského proteinu SLF1 (SMC5-SMC6 complex localization factor 1; homolog proteinu NON-SMC element 5, NSE5) a dále u proteinů Rtt107 a Brc1 u kvasinek. U jmenovaných proteinů je známo, že interagují se SMC5/6 komplexem a pomáhají mu s vazbou na chromatin. Avšak u rostlin nebyla potvrzena přítomnost této domény u proteinů, o kterých je známo, že se SMC5/6 interagují (Yan a kol., 2013), anebo se jinak zapojují do DDR. V nedávné studii

od Vladejíc a kol. (2022) se podařilo objevit u *Arabidopsis* šest proteinů obsahujících doménu BRCT5. Dva z těchto proteinů byly již známé proteiny BRCA1 a BARD1. Zbývající čtyři kandidátní proteiny byly nazvány BCP (BRCT5 domain-containing proteins) 1 až 4. Co se týče odpovědi na poškození DNA, vyšel jako nejslibnější kandidát protein BCP1, u kterého bylo zjištěno, že jeho transkripce je závislá na SOG1 a že mutanti *bcp1* jsou citliví vůči genotoxickým látkám. Dalším zjištěním bylo, že BCP1 je nutný pro normální četnost homologních rekombinací. BCP1 je tedy nově popsán protein, který má roli faktoru účastnícího se DDR, což bylo dále potvrzeno ve studii od Yu a kol. (2023).

Poté bylo u *Arabidopsis* identifikováno 7 proteinů, které fyzicky interagují s BCP1. Těmito proteiny jsou VDAC3, SYN2, XYL1, STUBL5, PANS1, protein bohatý na serin/arginin asociující se s CLK4 a jeden hypotetický protein (Vladejíc a kol., 2023, nepublikováno).

VDAC3 je napětově řízený aniontový kanál, který se nachází u mitochondrií. Je součástí celkem 5 izoform VDAC u *Arabidopsis* (Tateda a kol., 2011). SYN2 (též zvaný AtRAD21.1) se vyskytuje v rámci kohezinového komplexu. Bylo u něj zjištěno, že je potřebný k opravám DNA při výskytu DSB, které byly vyvolány endogenními stresy i těmi environmentálními. Dále se zdá, že může být zapojený do HR (da Costa-Nunes a kol., 2014). XYL1 kóduje  $\alpha$ -xylosidázu. Funguje jako supresor klíčení a rovněž je potřebná k udržení fyzických vlastností primární stěny buňky v rostoucích pletivech (Shigeyama a kol., 2016). STUBL5 je druh E3 ligázy, která rozpoznává a ubikvitinuje proteiny, jež byly SUMOylovány. U této ligázy bylo objeveno, že interaguje s myoziny XI (Kurth a kol., 2017). PATRONUS1 (PANS1) se účastní koheze sesterských chromatid během meiózy I a II (Zamariola a kol., 2014; Singh a kol., 2015; Cromer a kol., 2019). Funkce proteinu bohatého na serin/arginin asociujícího se s CLK4 (nazván BCP1 interacting candidate 2, BIC2) nebyla u *Arabidopsis* zatím více popsána; to samé se týká hypotetického proteinu (nazván BCP1 interacting candidate 1, BIC1).

Testování jmenovaných kandidátů jakožto proteinů potenciálně zapojených do DDR bylo cílem této bakalářské práce.

### 3.3.4 SMC5/6

V současnosti hojně studovanými molekulárními komplexy jsou takzvané proteiny strukturní údržby chromozomů (structural maintenance of chromosomes, SMCs). Tyto proteiny lze nalézt u organismů napříč taxonomickými doménami (Cobbe a Heck, 2000). SMCs se účastní procesů kondenzace chromozomů, koheze sesterských chromatid při mitóze

a uplatňují se během DDR (Lehmann, 2005; Hirano, 2005; Nasmyth, 2002). Co se týče funkčních struktur SMCs, nachází se na jejich N-konci motiv zvaný Walker A a na C-konci se nachází motiv Walker B. Tyto globulární motivy jsou schopny vázat se na DNA a zároveň mají ATPázovou aktivitu. Další strukturou je pantová doména, se kterou jsou Walker motivy spojeny dvěma rameny. V místě pantu se poté protein ohýbá, ramena se vinou kolem sebe a oba Walker motivy se střetávají a tvoří hlavu komplexu. SMCs fungují ve formě heterodimerů v rámci eukaryot, kdy se dimery k sobě přikládají v místě pantové domény (Haering a kol., 2002; Harvey a kol., 2002; Díaz a Pečinka, 2018).

U eukaryot se nachází nejméně 6 typů SMC proteinů. Součástí komplexů kohezinu jsou SMC1 a SMC3. V rámci kondenzinu nalezneme SMC2 a SMC4. Proteiny SMC5 a SMC6 existují v rámci komplexu zvaného SMC5/6, který se zapojuje do organizace DNA a udržování stability genomu (Murray a Carr, 2008). Součástí tohoto komplexu jsou přidružené proteiny zvané NON-SMC elementy (NSE). Těch se může navázat na komplex až 6. SMC5/6 je takto strukturován do 3 podjednotek, které tvoří NSE1-NSE3-NSE4, NSE5-NSE6 a NSE2-SMC5-SMC6 (Paleček a kol., 2006; Díaz a Pečinka, 2018).

Trimer NSE1-NSE3-NSE4 je důležitý pro vazbu komplexu na DNA, přičemž delece genů pro NSE1 je u *Arabidopsis* smrtelná. V genomu *Arabidopsis* lze nalézt dva paralogy genu NSE4, a to NSE4A a NSE4B. Kompletní ztráta funkce NSE4A je smrtelná; co se týče ztráty funkce NSE4B, rostliny se zdají ze somatického pohledu v normálu. V nedávné studii bylo zjištěno, že z těchto dvou paralogů je to právě NSE4A, který se zapojuje do oprav DNA a rovněž se účastní vývoje semen (Díaz a kol., 2019).

Zdá se, že NSE5-NSE6 dimer zastává roli při sestavování komplexu SMC5/6 a jeho lokalizaci na cílové místo. Pokud bychom tyto proteiny hledali u *Arabidopsis*, našli bychom homolog NSE6 s názvem suppressor of *npr1-1*, inducible 1 (SNI1) a NSE5 nazývaný se *Arabidopsis* SNI1 associated protein 1 (ASAP1) (Yan a kol., 2013; Díaz a Pečinka, 2018). Funkce těchto proteinů není zcela objasněna, avšak výzkumníci Paleček a kol. (2006) nám předkládají, že by mohly sloužit ke vzniku intramolekulárních můstků a sloužit k multimerizaci SMC5/6 komplexů.

Podjednotka NSE2-SMC5-SMC6 tvoří kostru komplexu SMC5/6. NSE2 (u *Arabidopsis* též zvaná methyl methanesulfonate-sensitive 21, MMS21 či high ploidy 2, HPY2) je SUMO ligáza, která je kovalentně navázána na ramenu SMC5 a jedna z jejích funkcí zahrnuje SUMOylaci faktorů účastnících se homologní rekombinace, čímž dojde ke stimulaci oprav DNA při poškození. Je vysoce pravděpodobné, že pomocí NSE2 dochází k řízení celkové

dynamiky komplexu v místě působení (Andrews a kol., 2005; Díaz a Pečinka, 2018; Whalen a kol., 2020). V genomu *Arabidopsis* lze nalézt 2 kopie genu SMC6, a to SMC6A a SMC6B. SMC6B se dá dohledat i pod názvem MIM (hypersensitive to MMS, irradiation and MMC; Mengiste a kol, 1999).

Mutanti *smc6a* a *smc6b* vykazují sníženou frekvenci homologní rekombinace (Watanabe a kol., 2009). Pomocí tohoto a dalších důkazů bylo usouzeno, že SMC5/6 napomáhá opravě DSB navozením homologní rekombinace mezi sesterskými chromatidami. SMC5/6 komplex zastupuje další role při DDR, jako stabilizace zastavené replikační vidlice či udržování integrity rDNA a (Wu a Yu, 2012). Nedávno byla potvrzena účast SMC5/6 na opravě DNA-proteinových crosslinků (Dvořák Tomašíková a kol., 2023).

## **4 MATERIÁL A METODY**

### **4.1 Biologický materiál**

Zkoumaným organismem byl huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Analyzováno bylo 7 genů kandidátních proteinů, a to za pomoci 10 T-DNA inzerčních linií. Semena T-DNA inzerčních mutantů (dále jen mutanti) byla pořízena z institutu SALK (Alonso a kol., 2003) a GABI-Kat (Kleinboelting a kol., 2012) přes Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC). Dále byla použita semena linií *smc6b-1* a WT, která sloužila jako pozitivní a negativní kontrola. V tabulce 1 jsou uvedeny použité linie a informace o nich. Podmínky, ve kterých byly rostliny pěstovány v průběhu jejich životního cyklu, jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tab. 1:** Použité linie huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a jejich charakteristika.

Název linie	Genetické pozadí	Identifikátor genu	Zdroj linie	Účel
WT	Col-0, wild type	–	Pečinka group	Negativní kontrola
<i>smc6b-1</i>	Col-0, T-DNA inzerční mutant	AT5G61460	SALK_101968C Pečinka group	Pozitivní kontrola
<i>vdac3-1</i> (Yang a kol., 2011)	Col-3, T-DNA inzerční mutant	AT5G15090	SALK_127899C NASC	Kandidátní mutant
<i>vdac3-2</i> (Yang a kol., 2011)	Col-0, T-DNA inzerční mutant	AT5G15090	SAIL_238_A01 NASC	Kandidátní mutant
<i>bic1-1</i>	Col-0, T-DNA inzerční mutant	AT1G61170	SALK_047755C NASC	Kandidátní mutant
<i>syn2-1</i>	Col-0, T-DNA inzerční mutant	AT5G40840	SALK_015096 NASC	Kandidátní mutant
<i>syn2-2</i>	Col-0, T-DNA inzerční mutant	AT5G40840	SALK_044851 NASC	Kandidátní mutant
<i>xyl1-2</i> (Sechet a kol., 2016)	Col-0, T-DNA inzerční mutant	AT1G68560	GABI_749G08 NASC	Kandidátní mutant
<i>stubl5-1</i>	Col-0, T-DNA inzerční mutant	AT5G04460	SALK_018459C NASC	Kandidátní mutant
<i>stubl5-2</i>	Col-3, T-DNA inzerční mutant	AT5G04460	SAIL_26_F07 NASC	Kandidátní mutant
<i>bic2-1</i>	Col-0, T-DNA inzerční mutant	AT4G36980	GABI_588E11 NASC	Kandidátní mutant
<i>pans1-1</i> (Cromer a kol., 2013)	Col-0, T-DNA inzerční mutant	AT3G14190	SALK_070337 NASC	Kandidátní mutant

**Tab. 2:** Růstové podmínky huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) v různých prostředích.

Prostředí	Podmínky		Účel
	Den	Noc	
Růstová komora	16 h	8 h	Klíčení semen
Percival	21 °C	18 °C	v médiích
Růstová komora	16 h	8 h	Růst rostlin
Fytotron	19 °C	18 °C	v substrátu
	vlhkost 65 %	vlhkost 65 %	
Skleník	16 h	8 h	Dozrávání šesulí
	24 °C	16 °C	a sběr semen

## 4.2 Použité chemikálie a roztoky

### 4.2.1 Použité chemikálie

- Agar bacteriological (VWR Chemicals, kat. č. 84609.0500)
- Agarose I™ (VWR Chemicals, kat. č. 0710)
- Destilovaná voda
- DreamTaq™ Green DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EP0714)
- Ethanol 98% (v/v) (Lach-Ner, kat. č. 20025-A96)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751)
- Fosfinitricin (Duchefa Biochemie, kat. č. P0159.0250)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, 6X TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM1331)
- Chlornan sodný (cca. 6-14% aktivovaného chlóru) EMPLURA® (Merck, kat. č. 105614)
- ICRF-187 (dexrazoxan) (Sigma-Aldrich, kat. č. D1446)
- Kanamycin (Sigma-Aldrich, kat. č. 60615)
- MMC (mitomycin C) (Sigma-Aldrich, kat. č. M0503)
- Murashige & Skoog medium (Duchefa Biochemie, kat. č. M0231)
- Nuclease-free Water (Thermo Fisher Scientific, kat. č. AM9932)
- 2-Propanol ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a., ACS, ISO (Carl Roth, kat. č. 6752)
- SUBSTRAL CAREO Ultra® – Koncentrát proti škůdcům (Evergreen Garden Care France SAS)
- Sulfadiazin (Sigma-Aldrich, kat. č. S8626)

- 50x TAE (Tris-acetát-EDTA) pufr
- TWEEN® 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P9416)
- Zebularin (Sigma-Aldrich, kat. č. Z4775)
- Zeocin™ (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R25001)

#### 4.2.2 Použité roztoky a jejich příprava

- 0,1% (w/v) agaróza: 100 mg agarózy rozpustit ve 100 ml dH<sub>2</sub>O, autoklávovat.
- 1% (w/v) gel pro fotodokumentaci: 0,5 g agaru rozpustit v 50 ml dH<sub>2</sub>O.
- 1% (w/v) agarózový gel obsahující 0,5μg·ml<sup>-1</sup> ethidium bromid: ke 2 g agarózy přidat 200 ml 1x TAE pufru, krouživým pohybem obsah lahve promíchat, pomocí mikrovlnné trouby přivést roztok k varu a ujistit se, že je agaróza zcela rozpuštěna. Nechat teplotu roztoku klesnout přibližně na 50 °C, poté přidat 2 μl 5% (w/v) zásobního roztoku ethidium bromidu a krouživým pohybem lahve roztok promíchat.
- 7% (v/v) roztok chlornanu sodného obsahující Tween 20: ke 3 ml dH<sub>2</sub>O přidat 7 ml zásobního roztoku chlornanu sodného a 100 μl Tweenu 20.
- Edwardsův extrakční pufr: za stálého míchání smísit 20 ml 1M Tris, 5 ml 5M NaCl, 5 ml 0,5M EDTA, 5 ml 10% (w/v) SDS a 65ml dH<sub>2</sub>O.
- ½ Murashige a Skoog (MS) médium v 0,6% (w/v) agaru: smíchat 22 g MS směsi solí, 10 g sacharózy, 1 g MES a 6 g agaru. Přidat 1000 ml dH<sub>2</sub>O. Upravit pH na hodnotu 5,8 pomocí KOH. Autoklávovat.
- ½ MS médium obsahující 10μmol·l<sup>-1</sup> ICRF-187: ½ MS médium v 0,6% (w/v) agaru rozpustit v mikrovlnné troubě. Ve vodní lázni nechat zchladnout na 37 °C. Do 50 ml média přidat 50 μl zásobního roztoku 10mmol·l<sup>-1</sup> ICRF-187.
- ½ MS médium obsahující 10μmol·l<sup>-1</sup> MMC: ½ MS médium v 0,6% (w/v) agaru rozpustit v mikrovlnné troubě. Ve vodní lázni nechat zchladnout na 37 °C. Do 50 ml média přidat 500 μl zásobního roztoku 1mmol·l<sup>-1</sup> MMC.
- ½ MS médium obsahující 20μmol·l<sup>-1</sup> zebularin: ½ MS médium v 0,6% (w/v) agaru rozpustit v mikrovlnné troubě. Ve vodní lázni nechat zchladnout na 37 °C. Do 50 ml média přidat 100 μl zásobního roztoku 10mmol·l<sup>-1</sup> zebularinu.
- ½ MS médium obsahující 10μg·ml<sup>-1</sup> zeocin: ½ MS médium v 0,6% (w/v) agaru rozpustit v mikrovlnné troubě. Ve vodní lázni nechat zchladnout na 37 °C. Do 50 ml média přidat 5 μl zásobního roztoku 100mg·ml<sup>-1</sup> zebularinu.



- ½ MS médium obsahující 100µg·ml<sup>-1</sup> sulfadiazin: ½ MS médium v 0,6% (w/v) agaru rozpustit v mikrovlnné troubě. Ve vodní lázni nechat zchladnout na 37 °C. Do 50 ml média přidat 50 µl zásobního roztoku 100mg·ml<sup>-1</sup> sulfadiazinu.
- ½ MS médium obsahující 10µg·ml<sup>-1</sup> fosfotricin: ½ MS médium v 0,6% (w/v) agaru rozpustit v mikrovlnné troubě. Ve vodní lázni nechat zchladnout na 37 °C. Do 50 ml média přidat 10 µl zásobního roztoku 50mg·ml<sup>-1</sup> fosfotricinu.
- ½ MS médium obsahující 50µg·ml<sup>-1</sup> kanamycin: ½ MS médium v 0,6% (w/v) agaru rozpustit v mikrovlnné troubě. Ve vodní lázni nechat zchladnout na 37 °C. Do 50 ml média přidat 25 µl zásobního roztoku 100mg·ml<sup>-1</sup> kanamycinu.
- hmotnostní standard s nanášecím pufrem: smíchat 1 µl hmotnostního standardu GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, 1 µl nanášecího pufru 6X TriTrack DNA Loading Dye a 4 µl dH<sub>2</sub>O.
- 50x TAE pufr: připravit 50x TAE pufr obsahující 2mol·l<sup>-1</sup> Tris pufr, 1mol·l<sup>-1</sup> kyselinu octovou a 0,05mol·l<sup>-1</sup> EDTA. pH upravit na hodnotu 8.
- 1x TAE pufr: 20 ml 50x TAE pufru doplnit na 1000 ml pomocí dH<sub>2</sub>O.

### 4.2.3 Použité primery

V tabulce 3 je uveden přehled primerů použitých při PCR za účelem genotypizace nemutované alely zkoumaného genu. V tabulce 4 je uveden přehled primerů použitých při PCR za účelem genotypizace mutované alely zkoumaného genu.

**Tab. 3:** Charakteristika a přehled primerů použitých při genotypizaci nemutovaných alel zkoumaných genů.

Identifikátor genu	Název primeru	Forward/ Reverse primer	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost PCR produktu [bp]	Mutantní linie
AT5G15090	PR_153	F	TCGTTTCCGTCAGATTTATGC	1010	<i>vdac3-2</i>
	PR_154	R	TGCCAGATTCGGTGTTATAGG		
	PR_155	F	TAACAATAAACCCATCGCACC	1078	<i>vdac3-1</i>
	PR_156	R	AGACATTGTCAAAGACTCAAC AAC		
AT1G61170	PR_157	F	AATGAACTCTTTGTGGGCTTG	1100	<i>bic1-1</i>
	PR_158	R	AATTATTACCGGTGACCTGGG		
AT5G40840	PR_159	F	AAAAGCCTGAGCACTCATGAG	1186	<i>syn2-1</i>
	PR_160	R	GGAACAAGTCCACAGTTCTCG		
	PR_161	F	TGTGGTTGCCCAGTTTTTAAG	1255	<i>syn2-2</i>
	PR_162	R	CTGAAGAAGCATCCGTCAGAG		
AT1G68560	PR_163	F	CATGGCAAATCAAGATTTGC	1094	<i>xyl1-2</i>
	PR_164	R	GTTCAAGAAATCTCCGGATCC		
AT5G04460	PR_165	F	ACGCCTGCCTACCTCTAACTC	1072	<i>stubl5-1</i>
	PR_166	R	CAGCCTTTGCTACAAAAATCG		
	PR_167	F	GCATAGAGTGACGAGACCAGC	1042	<i>stubl5-2</i>
	PR_168	R	GCTTGCTTGCTGATAATTTGC		
AT4G36980	PR_171	F	TTTCCTCAACCAACAAGTGG	1188	<i>bic2-1</i>
	PR_172	R	TCCTTGGGACAAGGTACATTG		
AT3G14190	PR_173	F	ATTCTGCCAACGGCTAGAAAC	1267	<i>pans1-1</i>
	PR_174	R	CATGGAGTCGAGTTCTTCAGC		

**Tab. 4:** Charakteristika a přehled primerů použitých při genotypizaci mutovaných alel zkoumaných genů.

Identifikátor genu	Název primeru	Forward/ Reverse primer	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost PCR produktu [bp]	Mutantní linie
AT5G15090	LB3	F	TAGCATCTGAATTCATAACCAA TCTCGATACAC	492–792	<i>vdac3-2</i>
	PR_154	R	TGCCAGATTCGGTGTATAGG		
	LBb1.3	F	ATTTTGCCGATTCGGAAC	456–756	<i>vdac3-1</i>
	PR_156	R	AGACATTGTCAAAGACTCAAC AAC		
AT1G61170	LBb1.3	F	ATTTTGCCGATTCGGAAC	537–837	<i>bic1-1</i>
	PR_158	R	AATTATTACCGGTGACCTGGG		
AT5G40840	LBb1.3	F	ATTTTGCCGATTCGGAAC	573–873	<i>syn2-1</i>
	PR_160	R	GGAACAAGTCCACAGTTCTCG		
	LBb1.3	F	ATTTTGCCGATTCGGAAC	582–882	<i>syn2-2</i>
	PR_162	R	CTGAAGAAGCATCCGTCAGAG		
AT1G68560	o8409	F	ATATTGACCATCATACTCATTGC	573–873	<i>xyl1-2</i>
	PR_164	R	GTTCAAGAAATCTCCGGATCC		
AT5G04460	LBb1.3	F	ATTTTGCCGATTCGGAAC	449–749	<i>stubl5-1</i>
	PR_166	R	CAGCCTTTGCTACAAAAATCG		
	LB3	F	TAGCATCTGAATTCATAACCAA TCTCGATACAC	434–734	<i>stubl5-2</i>
	PR_168	R	GCTTGCTTGCTGATAATTG		
AT4G36980	o8409	F	ATATTGACCATCATACTCATTGC	509–809	<i>bic2-1</i>
	PR_172	R	TCCTTGGGACAAGGTACATTG		
AT3G14190	LBb1.3	F	ATTTTGCCGATTCGGAAC	579–879	<i>pans1-1</i>
	PR_174	R	CATGGAGTCGAGTTCTTCAGC		

## 4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

### 4.3.1 Přístroje a zařízení

- Adaptérový set TissueLyser (Qiagen)
- Biologický termostat BT 120 M (EKOM s. r. o., Polná)
- Centrifuga chlazená Heraeus Multifuge X1R (Thermo Fisher Scientific)
- Centrifuga MiniStar (VWR International)
- Centrifuga MyFuge™ Mini (Benchmark Scientific)
- Digitální grafická tiskárna A6 UP-D897 (Sony)
- Fotoaparát D5600 (Nikon)
- Gelový dokumentační systém InGenius 3 (Syngene)
- Gelový dokumentační systém InGenius LHR (Syngene)
- Homogenizátor TissueLyser MM 301 (Retsch)
- Horizontální elektroforetický systém MultiSUB Choice Trio (Cleaver Scientific)
- Horizontální elektroforetický systém Owl™ A6 (Thermo Fisher Scientific)
- Chladnička R 6192 DW (Gorenje)
- Chladnička RSC064WW8 (Hyundai)
- Chladnička s mrazákem K 420 BA (Eurotech)
- Kamera Retiga-2000R ke stereomikroskopu (QImaging®)
- Laminární box Jouan MSC 9 (Thermo Fisher Scientific)
- Laminární box MSC-Advantage™ 1.2 (Thermo Fisher Scientific)
- Mikrovlnná trouba EMN 2015 (Zanussi)
- Mikrovlnná trouba MOC 20100 (Beko)
- Mrazák GNP 4355 (Liebherr)
- Předvážky GM 3101 (Sartorius)
- Růstová komora (Percival Scientific)
- Růstová komora Fytotron (Weiss Technik)
- Stereomikroskop SZX16 (Olympus)
- Termocyklér C1000 Touch™ (Bio-Rad Laboratories)
- Třepačka Multi-Vortex V-32 (Grant Instruments)
- Třepačka Reax Control (Heidolph Instruments)
- Vodní lázeň TW8 (JULABO)
- Výrobek ledu GM 360 (NTF – Nuove Tecnologie del Freddo)
- Zdroj napětí k elektroforéze PowerPac™ Basic (Bio-Rad Laboratories)
- Zdroj napětí k elektroforéze PowerPro 300 (Cleaver Scientific)

### 4.3.2 Programy

- GeneSnap (SynGene)
- ImageJ (Java)
- Microsoft Excel (Microsoft)
- Minitab (Minitab, LLC)
- QCapture
- SnapGene (GSL Biotech LLC)

## 4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

### 4.4.1 Sterilizace povrchu semen – suchá

Tento sterilizační postup byl použit k výsevu semen na selekční média. Potřebné množství semen bylo odděleno do 1,5ml mikrozkušavky. Dále postup pokračoval v laminárním boxu, kde bylo do této mikrozkušavky napipetováno 500  $\mu\text{l}$  70% (v/v) ethanolu a obsah byl mísen pomocí třepačky po dobu 10 minut. Roztok ethanolu byl z mikrozkušavky odstraněn a dále byla semena krátce promyta 500  $\mu\text{l}$  98% (v/v) ethanolu. Roztok byl odstraněn a otevřená mikrozkušavka se semeny byla v laminárním boxu ponechána, dokud nedošlo k odpaření zbývajícího roztoku ethanolu. Poté byla uzavřená zkušavka skladována v chladničce při 4 °C anebo byla semena ihned vyseta na selekční médium.

### 4.4.2 Selektce mutantních rostlin

Volba herbicidu pro přípravu selekčního média se odvíjela od vektoru T-DNA a v něm přítomného genu rezistence. V tabulce 5 jsou uvedeny vektory a geny rezistence pro jednotlivé mutantní linie. K selekci bylo použito  $\frac{1}{2}$  MS médium v 0,6% (w/v) agaru. Semena mutantní linie GABI byla selektována na médiu s obsahem sulfadiazinu o koncentraci 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Semena z linie SAIL byla selektována na médiu s obsahem fosfinitricinu o koncentraci 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Semena z linie SALK byla selektována na médiu s obsahem kanamycinu o koncentraci 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Výsev semen probíhal v laminárním boxu. Sterilizovaná semena byla nabrána plochou stranou autoklávovaného dřevěného párátko a rovnoměrně rozseta po selekčním médiu v Petriho misce. Uzavřená Petriho miska byla přemístěna do růstové komory Percival. Po 7 až 10 dnech byla provedena selektce semenáčů. Pro potvrzení homozygotnosti selektovaných mutantů byli tito jedinci podrobena genotypizaci.

**Tab. 5:** Vektory a geny rezistence přítomné v daných genech mutantních linií a herbicidy použité k jejich selekci.

<b>Identifikátor genu</b>	<b>Mutantní linie</b>	<b>Vektor</b>	<b>Gen rezistence</b>	<b>Herbicid</b>
AT1G68560	<i>xyl1-2</i>	pAC161	<i>SUL1</i>	sulfadiazin
AT4G36980	<i>bic2-1</i>	pGABI1	<i>SUL1</i>	sulfadiazin
AT5G15090	<i>vdac3-1</i>	pROK2	<i>NPTII</i>	kanamycin
	<i>vdac3-2</i>	pCSA110	<i>BAR</i>	fosfinotricin
AT5G04460	<i>stubl5-2</i>	pCSA110	<i>BAR</i>	fosfinotricin
	<i>stubl5-1</i>	pROK2	<i>NPTII</i>	kanamycin
AT1G61170	<i>bic1-1</i>	pROK2	<i>NPTII</i>	kanamycin
AT3G14190	<i>pans1-1</i>	pROK2	<i>NPTII</i>	kanamycin
AT5G40840	<i>syn2-1</i>	pROK2	<i>NPTII</i>	kanamycin
	<i>syn2-2</i>	pROK2	<i>NPTII</i>	kanamycin

#### 4.4.3 Extrakce genomické DNA

Do 1,2ml zkumavek v proužku byly na dno přidány homogenizační skleněné kuličky. Pomocí nůžek a pinzety byl odejmut malý kousek listu (přibližně o ploše 2 mm<sup>2</sup>) z každé rostliny a umístěn do samostatné zkumavky. Po dokončení sběru vzorků byly zkumavky uzavřeny víčkem a vloženy do kapalného dusíku.

Vzorky byly následně umístěny do adaptérového setu a vloženy do homogenizátoru TissueLyser, jehož oscilační frekvence byla nastavena na 30 Hz. Homogenizace probíhala po dobu 60 s, poté byl každý adaptérový set se zkumavkami otočen o 180° a vzorky byly znovu homogenizovány po dobu 60 s při frekvenci 30 Hz.

Do zkumavek s homogenizovanými vzorky bylo pipetováno 100 µl Edwardsova extrakčního pufru (dle Edwardse a kol., 1991, upraveno). Obsah zkumavek byl mísen pomocí vířivé třepačky a následně centrifugován po dobu 10 min při relativní centrifugační síle

2250 g. Ze supernatantu každého vzorku bylo přemístěno 80  $\mu\text{l}$  do nové 200 $\mu\text{l}$  mikrozkušavky v proužku. K odebranému supernatantu bylo přidáno 80  $\mu\text{l}$  isopropanolu. Mikrozkušavky byly uzavřeny, obsah byl promísen pomocí třepačky a centrifugován při 2250 g po dobu 10 min. Veškerý supernatant byl odebrán a k peletu bylo přidáno 80  $\mu\text{l}$  70% (v/v) ethanolu. Mikrozkušavky byly opět centrifugovány při 2250 g po dobu 10 min. Supernatant byl odebrán. Otevřené mikrozkušavky byly vloženy do biologického termostatu na 30 min při 37 °C, aby došlo k odpaření přebytečného roztoku ethanolu. Pelet byl resuspendován v 50  $\mu\text{l}$  vody bez nukleáz a skladován v chladničce při 4 °C.

#### 4.4.4 Genotypizace

Extrahovaná genomická DNA byla použita k přípravě reakční směsi polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR). Reakční směs byla v průběhu přípravy chlazená ledem. V tabulce 6 jsou uvedeny složky reakční směsi a v tabulce 7 je uveden teplotní program reakce. Vzorek genomické DNA linie WT byl použit jako negativní kontrola. Genotypizace daného vzorku pomocí PCR probíhala v párové reakci. V první reakci byly použity primery k amplifikaci části sekvence nemutované alely. V druhé reakci byly použity primery k amplifikaci části sekvence mutované alely. To znamená, že u vzorku patřícímu jedinci bez mutace v dané alele vznikl amplikon pouze v první reakci, u vzorku jedince homozygotního pro mutaci v dané alele vznikl amplikon pouze v druhé reakci, a u vzorku jedince heterozygotního pro mutaci v dané alele vznikl amplikon v obou reakcích.

Výsledky PCR byly analyzovány pomocí agarózové gelové elektroforézy. Do nalévací vaničky s vloženým hřebenem byl nalit 1% (w/v) agarózový gel obsahující 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ethidium bromid. Ze ztuhlého gelu byl vytáhnut hřeben a gel v nalévací vaničce byl umístěn do horizontální elektroforetické vany obsahující 1x TAE pufr. Do první jamky bylo přidáno 6  $\mu\text{l}$  hmotnostního standardu s nanášecím pufr. Do následujících jamek bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  produktu PCR. Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji stejnosměrného elektrického napětí o hodnotě 100–150 V. Po dostatečné separaci byla pořízena fotodokumentace gelu pomocí systému InGenius a programu GeneSnap.

**Tab. 6:** Složky reakční směsi PCR o celkovém objemu 20  $\mu\text{l}$ .

Složky	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
Voda bez nukleáz	12,9
10X DreamTaq™ Green Buffer	2
2mmol·l <sup>-1</sup> dNTPs	2
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ forward primer	1
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ reverse primer	1
5U· $\mu\text{l}^{-1}$ DreamTaq™ Polymerase	0,1
DNA templát	1

**Tab. 7:** Teplotní program pro PCR.

Počáteční denaturace	95 °C	3 min
35 cyklů	Denaturace	95 °C 30 s
	Annealing	55 °C 30 s
	Elongace	72 °C 60 s
Konečná elongace	72 °C	10 min
Ukončení reakce	4 °C	$\infty$

#### 4.4.5 Pěstování rostlin a sběr semen

Semenáče homozygotních, popř. heterozygotních, mutantů byly zasazeny do květináče se substrátem (TS 1, Klasmann-Deilmann). Ten byl ošetřen přípravkem SUBSTRAL CAREO Ultra, jehož účinnou látkou je insekticid acetamiprid. Roztok použitý k ošetření obsahoval acetamiprid o koncentraci 50 mg·l<sup>-1</sup>. Poté byly semenáče přemístěny do růstové komory Fytotron. Zde pokračoval jejich růst. Po tvorbě květů, samosprášení a vzniku šesulí byly



rostliny přemístěny do skleníku, kde byly přichystány ke sběru semen. Prýt rostliny byl vložen do papírového sáčku, který byl uzavřen lepicí páskou a připevněn k dřevěné tyči. Po odumření a vysušení rostliny byl sáček s prýtem odejmut a následoval sběr semen. Sáček byl po celé své délce krátce promnut mezi dlaněmi, aby došlo k otevření chlopní šesulí a uvolnění semen. Pomocí síta byl od semen oddělen zbylý rostlinný materiál a semena byla skladována v plastové mikrozkumavce při pokojové teplotě či v chladničce při 4 °C.

#### 4.4.6 Sterilizace povrchu semen

Tento sterilizační postup byl použit k výsevu semen na eseje citlivosti vůči poškození DNA. Semena huseníčku byla sklizena ze suchých rostlin. Potřebné množství semen bylo odděleno do 1,5ml mikrozkumavky. Dále postup pokračoval v laminárním boxu, kde bylo do této mikrozkumavky napipetováno 500 µl 70% (v/v) ethanolu a obsah byl mísen pomocí třepačky po dobu 5 minut. Roztok ethanolu byl z mikrozkumavky odstraněn a bylo přidáno 500 µl 7% (v/v) chlornanu sodného obsahujícího Tween® 20. Obsah byl mísen pomocí třepačky po dobu 10 minut. Roztok chlornanu sodného byl z mikrozkumavky odstraněn a bylo přidáno 500 µl destilované vody. Obsah byl mísen pomocí třepačky po dobu 5 minut. Voda byla odstraněna a tento krok promývaní destilovanou vodou byl opakován ještě dvakrát. Po posledním promytí byla voda odstraněna a bylo přidáno 500 µl 0,1% (w/v) agarózy. Takto ošetřená semena byla skladována v chladničce při 4 °C po dobu 48 h, aby došlo ke stratifikaci a tím ke sjednocení klíčení po výsevu.

#### 4.4.7 Eseje citlivosti vůči poškození DNA

Eseje citlivosti vůči poškození DNA byly provedeny celkově ve 3 replikátech. Replikát probíhal tak, že v laminárním boxu byla připravena čtyři ½ MS média v 0,6% (w/v) agaru obsahující konkrétní genotoxickou látku. Jednotlivá média obsahovala následující látky o dané koncentraci: ICRF-187 (10 µmol·l<sup>-1</sup>), MMC (10 µmol·l<sup>-1</sup>), zebularin (20 µmol·l<sup>-1</sup>), zeocin (10 µg·ml<sup>-1</sup>). Páté médium neobsahovalo žádnou genotoxickou látku a bylo nazváno Mock.

Použité chemikálie mají následující genotoxické účinky: ICRF-187 – katalytická inhibice topoizomerázy II (Lyu a kol., 2007); MMC – vznik crosslinků mezi vlákny DNA (Ueda a Komano, 1984; Tomasz a kol. 1987); zebularin – tvorba DNA-proteinových crosslinků (Procházková a kol., 2022); zeocin – vznik dvouvláknových zlomů DNA (Berdy, 1980).

Sterilizovaná a stratifikovaná semena v 0,1% (w/v) agaróze byla automatickou pipetou vyseta na média. Vysévána byla semena homozygotních mutantních linií, linie WT sloužící jako negativní kontrola a linie *smc6b-1* sloužící jako pozitivní kontrola. Od každé linie bylo

použito 20–30 semen. Takto připravené eseje byly přeneseny do růstové komory Percival, kde zůstaly po dobu 7 dní.

Po uplynutí jednoho týdne byly semenáče z esejí přemístěny pomocí pinzety na povrch 1% (w/v) agaru v Petriho misce tak, aby byly jejich kořeny narovnány v horizontální pozici. Semenáče byly vyfoceny fotoaparátem a délky jejich primárních kořenů byly změřeny pomocí pluginu SmartRoot programu ImageJ. Z naměřených délek kořenů dané linie pocházející z dané esejí byl vypočítán aritmetický průměr. Ze 3 průměrů pocházejících od dané linie ze všech 3 replikátů byl vypočítán konečný aritmetický průměr a směrodatná odchylka. (Tyto hodnoty byly použity ve sloupcových grafech.) V programu Minitab byla testována statistická signifikance pomocí jednocestné ANOVy s post-hoc Tukeyho testem.

#### **4.4.8 Hodnocení semen**

U heterozygotních mutantů, kteří neprodukovali homozygotní potomky, byl zkoumán počet a stav semen v šesulích za využití mikroskopu. Z heterozygotních linií neprodukujících homozygoty byly vybráni 3 zástupci staří 8 týdnů a od každého bylo odebráno 5 šesulí. Pomocí pinzet byly obě chlopně šesule postupně otevřeny. Hodnotil se počet abortovaných vajíček, abortovaných semen a počet normálních semen. Pro porovnání byla použita linie WT.

#### **4.4.9 Testy somatických fenotypů**

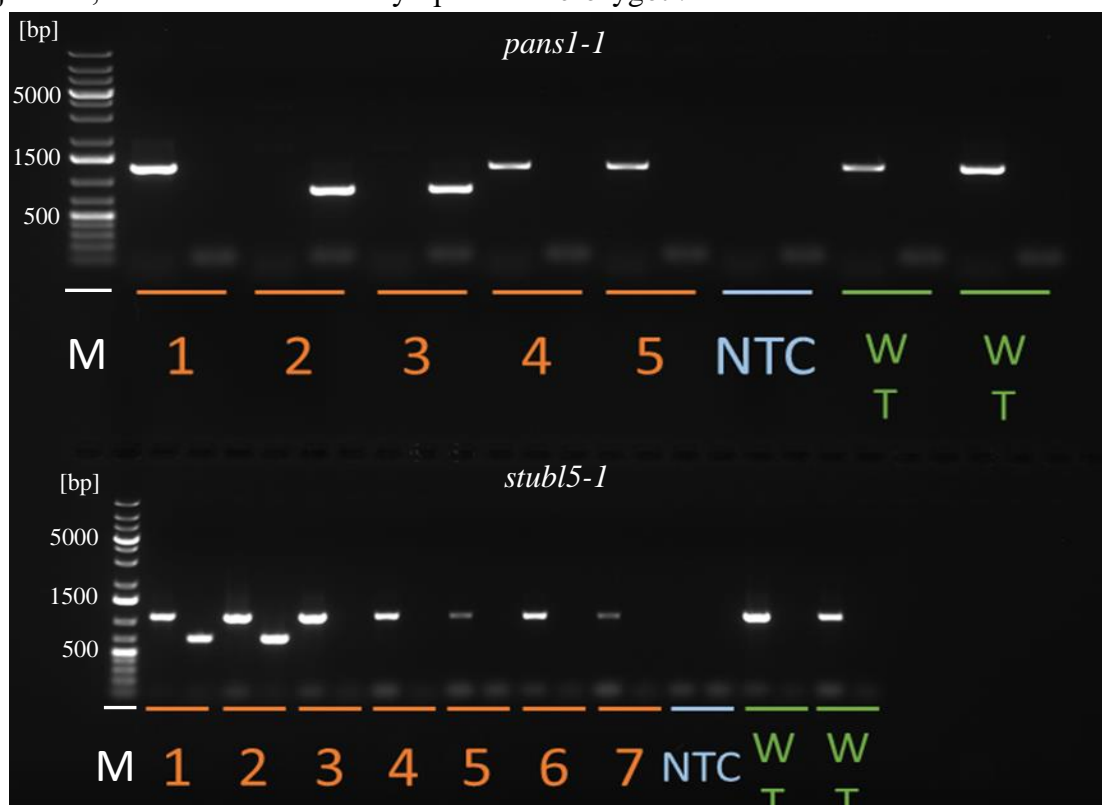
Do samostatných květináčů se substrátem byla vyseta semena kandidátních linií a semena linie WT. Substrát byl ošetřen přípravkem SUBSTRAL CAREO Ultra a květináče se semeny byly umístěny do růstové komory Percival. Po vyklíčení semen byly 3 semenáče od každé homozygotních linií a linie WT přesazeny samostatně do květináčů. Od heterozygotních linií bylo 8 semenáčů samostatně přesazeno do květináčů. Všechny květináče byly přemístěny do růstové komory Fytotron. Po 4 týdnech od vysetí byla pořizena fotodokumentace fenotypů rostlin. U heterozygotních linií byla provedena genotypizace, aby se vyloučili potomci bez mutace.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Selekcce mutantních rostlin

Z 10 linií kandidátních mutantů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) jsem pomocí selekčních médií a genotypizace identifikoval homozygotní mutanty generace F1, kteří náleželi k 5 z těchto linií. Byly to následující linie: *vdac3-2*, *bic1-1*, *xyl1-2*, *stubl5-2* a *pans1-1*. V rámci genotypizace nebyla nakonec potřeba purifikovat PCR produkty. Na obrázku 2 je příklad elektroforetogramu genotypizace jedinců linie *pans1-1* a *stubl5-1*. Dále jsem identifikoval heterozygotní mutanty generace F1, kteří náleželi k liniím *stubl5-1* a *bic2-1*. Semena linií *vdac3-1*, *syn2-1* a *syn2-2* neklíčila na selekčních médiích. Semena jsem vysel na ½ MS médium v 0,6% (w/v) agaru bez žádného herbicidu. Vyšetří těchto 3 linií na růstové médium jsem zopakoval celkem třikrát, nepodařilo se ale získat žádné semenáče.

Semena homozygotních mutantů, z nichž vzešla generace F2, jsem sesbíral. Potomky generace F2 heterozygotních mutantů jsem podrobil selekci na selekčních médiích a genotypizaci, abych identifikoval homozygoty. Od obou linií *stubl5-1* a *bic2-1* jsem použil 60 jedinců, avšak identifikováni byli pouze heterozygoti.



**Obr. 2:** Horní elektroforetogram: čísla 2 a 3 značí signály ampliconů pro homozygotní jedince *pans1-1*. Dolní elektroforetogram: čísla 1 a 2 značí signály ampliconů pro heterozygotní jedince *STUBL5-1/stubl5-1*. M – DNA marker relativní molekulové hmotnosti. NTC – kontrola bez templátu (no template control). WT – negativní kontrola pomocí linie WT.

## 5.2 Eseje citlivosti vůči poškození DNA

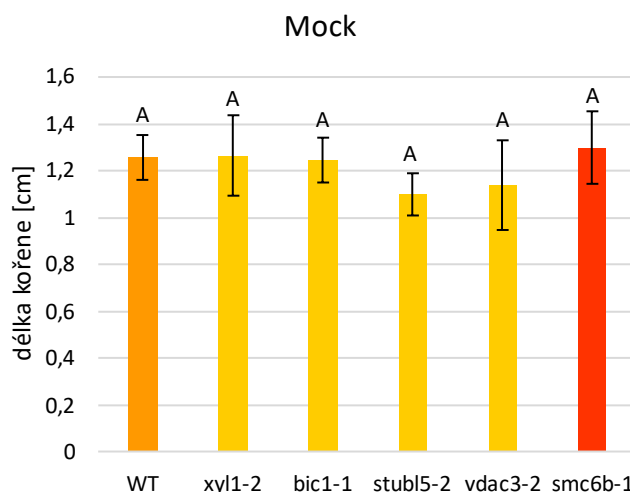
Semena 5 homozygotních linií *vdac3-2*, *bic1-1*, *xyl1-2*, *stubl5-2* a *pans1-1* jsem vyzel na eseje citlivosti vůči poškození DNA. V experimentech jsem použil tyto genotoxické látky: ICRF-187 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), MMC ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), zebularin ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a zeocin ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Experiment jsem provedl celkem ve 3 replikátech.

Provedl jsem genotypizaci semen těchto linií, abych potvrdil, že se skutečně jedná o homozygotní mutanty. Do 5 mikroskopavek jsem od každé z 5 linií odebral vzorek děložního listu ze 30 jedinců, extrahoval genomickou DNA a provedl genotypizaci. U linií *vdac3-2*, *bic1-1*, *xyl1-2* a *stubl5-2* byla potvrzena homozygotnost. Avšak u linie *pans1-1* byly na elektroforetogramu vizualizovány amplikony mutované i nemutované alely. Genotypizoval jsem semenáče od druhé záložní rostliny linie *pans1-1*; výsledek byl stejný. Tato linie byla z experimentů vyloučena. Z časových důvodů jsem již nebyl schopen selektovat další homozygotní mutanty linie *pans1-1*.

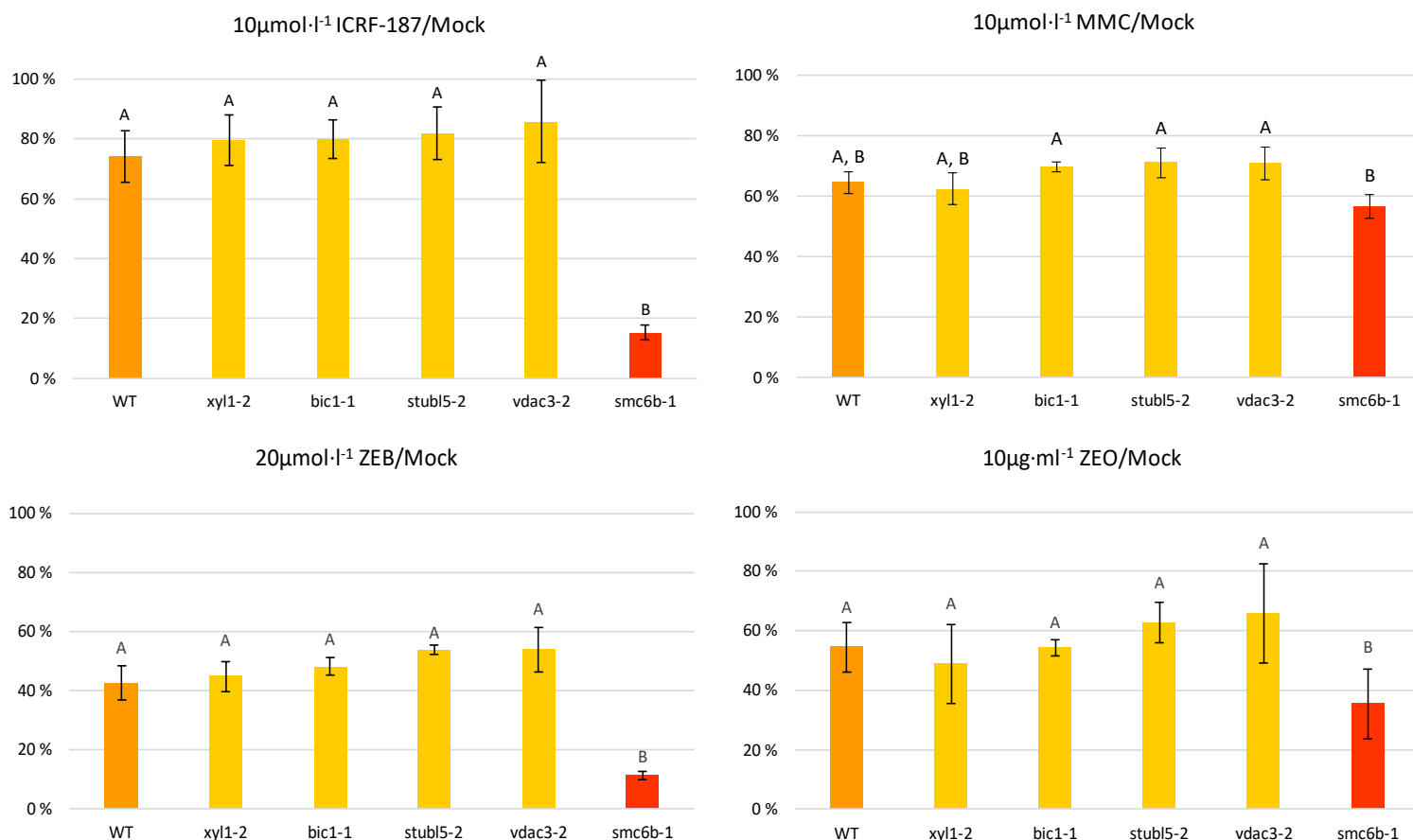
Testovaná citlivost linií ke genotoxickým látkám byla porovnána s citlivostí linie *smc6b-1*. Tato mutantní linie je ke genotoxickým látkám vysoce citlivá. Redukce délky kořene linie *smc6b-1* při vystavení dané genotoxické látce ku délce kořene při růstu v kontrolních podmínkách byly následující: ( $15,22\pm 2,45$ )% na ICRF-187; ( $56,46\pm 3,94$ )% na MMC; ( $11,20\pm 1,51$ )% na zebularinu a ( $35,49\pm 11,78$ )% na zeocinu.

V porovnání s linií *smc6b-1* neměla žádná z testovaných linií takovou silnou reakci na dané genotoxické látky. Statistické testy nepotvrdily signifikantní rozdíl v redukci délky kořene testovaných mutantních linií v porovnání s linií WT (Obr. 3 a 4).

V případě potvrzení signifikantního rozdílu v redukci délky kořene testovaných mutantních linií v porovnání s linií WT bylo původně v plánu dále provést eseje buněčné smrti. Ty se používají ke stanovení míry poškození na buněčné úrovni danou genotoxickou látkou, kde se pomocí fluorescenční mikroskopie sleduje frekvence mrtvých buněk v primárním kořeni.



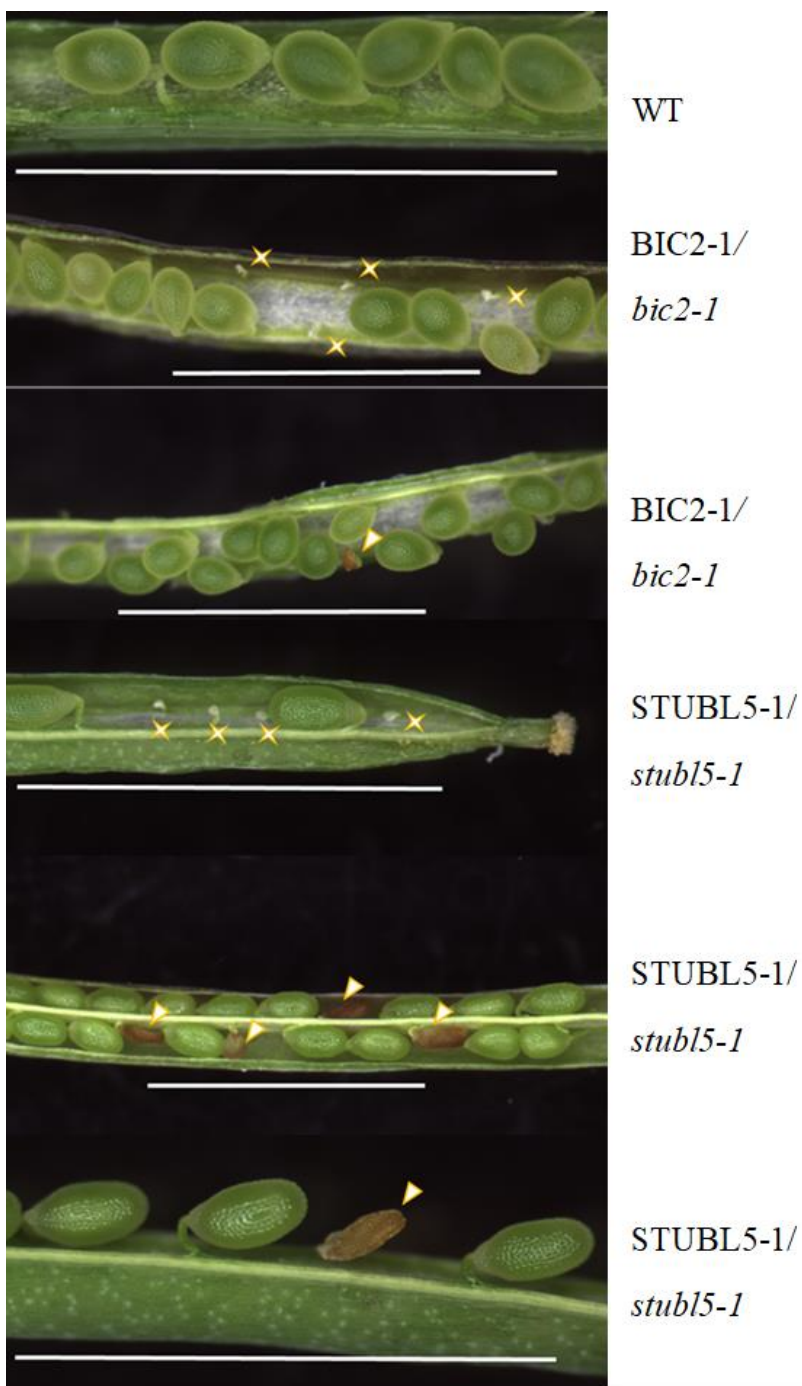
**Obr. 3:** Délka kořenů WT a mutantních rostlin rostoucích v kontrolních podmínkách (Mock). Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku mezi průměry 3 biologických replikátů. Stejné písmeno značí vzorky, které se významně nelišily v jednocestné ANOVA s posthoc Tukeyho testem ( $P < 0,05$ ).



**Obr. 4:** Relativní délka kořenů WT a mutantních rostlin vůči délce kořenů na Mock. Rostliny rostly v podmínkách s genotoxickou látkou. Chybové úsečky značí směrodatnou odchylku mezi průměry 3 biologických replikátů. Stejné písmeno značí vzorky, které se významně nelišily v jednocestné ANOVA s posthoc Tukeyho testem ( $P < 0,05$ ).

### 5.3 Hodnocení semen

U linií s mutací v genu BIC2 a STUBL5 se nepodařilo selektovat jedince s homozygotní konstitucí. Vybral jsem tři heterozygotní jedince BIC2-1/*bic2-1* a tři heterozygotní jedince STUBL5-1/*stubl5-1*, kteří byli staří 8 týdnů. Od každého z nich jsem sesbíral 5 šesulí a za pomoci mikroskopu jsem zhodnotil stav a zastoupení semen. Výsledky jsou na obrázku 5 a v tabulce 8.



**Obr. 5:** Fenotyp semen rostlin wild-type (WT), heterozygota BIC2-1/*bic2-1* a heterozygota STUBL5-1/*stubl5-1*. Hvězda značí abortovaná vajíčka. Šipka značí abortovaná semena. Bílé měřítko značí 3 mm.

**Tab. 8:** Hodnocení stavu a zastoupení semen u heterozygotních linií BIC2-1/*bic2-1* a STUBL5-1/*stubl5-1* v porovnání s WT.

<b>Linie</b>	<b>Semena s normálním vývojem</b>	<b>Abortovaná vajíčka</b>	<b>Abortovaná semena</b>	<b>Celkový počet hodnocených semen</b>
WT	95,5 %	4,5 %	0 %	972
BIC2-1/ <i>bic2-1</i>	78,5 %	21,3 %	0,2 %	887
STUBL5-1/ <i>stubl5-1</i>	76,5 %	11,5 %	12 %	567

## 5.4 Somatický fenotyp

V kontrolovaném prostředí růstové komory Fytotron byla vyseta semena WT, homozygotních mutantů *xyll1-2*, *vdac3-2*, *stubl5-2*, *bic1-1* a heterozygotních mutantů *STUBL5-1/stubl5-1*, *BIC2-1/bic2-1*. Fotodokumentace byla pořízena 4 týdny po výsevu, kdy rostliny byly ve stádiu růžice (Obr. 6).



**Obr. 6:** Somatické fenotypy mutantů v porovnání s WT. Růst probíhal v substrátu v růstové komoře a fotografie byla pořízena 4 týdny po vysetí. Bílé měřítko odpovídá 1 cm.



## 6 DISKUSE

Signální dráha odpovědi na poškození DNA (DDR) je spletitou sítí, která dohlíží na škody vzniklé v genomu organismu a dohlíží na jejich opravu. K její aktivaci je zapotřebí řady událostí, mezi něž patří rozpoznání poškození, signalizace a vyvolání opravných mechanismů v cílovém místě. U rostlin je DDR klíčová pro odezvu na rozličné stresové faktory a rovněž se účastní regulace buněčných pochodů, jakými je růst a vývoj, průběh buněčného cyklu či programovaná buněčná smrt. Mezi klíčové signální molekuly účastnící se DDR patří kinázy ATM a ATR, přes něž je aktivován ústřední transkripční faktor SOG1, funkční analog proteinu p53.

Ve své práci jsem navazoval na výzkum publikovaný Vladejíc a kol. (2022), ve kterém byl u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) identifikován protein BCP1, jenž se účastní DDR a spadá pod přímou kontrolu SOG1. Pomocí metod zahrnujících výzkum protein-proteinových interakcí bylo identifikováno sedm kandidátních proteinů, které přímo interagují s BCP1 (Vladejíc a kol., 2023, nepublikováno). Těmito proteiny jsou VDAC3, SYN2, XYL, STUBL5, PANS1, BIC1 a BIC2.

Avšak bylo zapotřebí otestovat jejich zapojení do opravných drah poškození DNA. Úspěšně jsem selektoval homozygotní mutanty linií *vdac3-2*, *xyl1-2*, *stubl5-2* a *bic1-1*. Ti byli podrobeni esejím citlivosti vůči poškození DNA. Aby byly otestovány nejrůznější dráhy DDR, ve kterých by mohly být tyto proteiny zapojeny, použil jsem čtyři genotoxické látky vyvolávající rozdílné formy genotoxicity. Použité látky byly zeocin, což je radiomimetikum vyvolávající dvouvláknové zlomy DNA (Berdy, 1980); zebularin, který dává vzniku DNA-proteinovým crosslinkům (Procházková a kol., 2022); mitomycin C, jenž způsobuje crosslinky mezi komplementárními vlákny DNA (Ueda a Komano, 1984; Tomasz a kol. 1987); a ICRF-187, působící jako katalytický inhibitor topoizomerázy II (Lyu a kol., 2007).

Ze čtyř testovaných linií žádná nevykazovala citlivost k testovaným genotoxickým látkám. Je nutné podotknout, že linie *vdac3-2* a *bic1-1* obsahují T-DNA inzert v místech, které nejsou součástí exonů kódující oblasti genu (polohy inzercí v genech jednotlivých linií jsou uvedeny v Příloze 1). Exprese těchto genů nemusela být ovlivněna. Míru exprese těchto genů v daných liniích by bylo možné otestovat pomocí RT-qPCR v porovnání s WT linií. Další možností by mohlo být objednání nových mutantních linií a znovu je podrobit testům. Zbývající linie *xyl1-2* a *stubl5-2* byly vyloučeny z budoucích analýz týkajících se interakce s BCP1.

Dvě testované linie, *bic2-1* a *stubl5-1*, neprodukovaly homozygotní potomky. Otestoval jsem semena v šešulích heterozygotních jedinců, abych zjistil, zdali byl problém ve vývoji

semen. Pokud by homozygotní konstituce dané mutace skutečně způsobovala neslučitelnost se životem, tak by po samosprášení rostliny byl poměr normálních vůči abnormálním semenům 3:1. Abortovaná semena značí, že nastala chyba v průběhu vývoje semen. Pokud by daná mutantní alela interferovala se správným průběhem vývoje vajíčka, pozoroval bych u heterozygotních jedinců produkci 50 % abortovaných vajíček.

Výsledky hodnocení semen heterozygotní linie BIC2-1/*bic2-1* ukázaly, že 21,3 % vajíček bylo abortovaných. Rovněž co se týče fenotypu heterozygotních jedinců této linie ve stáří 4 týdnů, byl jejich vzrůst výrazně redukovaný v porovnání s WT. To vše by mohlo naznačovat přítomnost další mutace, která v kombinaci s *bic2-1* činí nemožnost vzniku homozygotů *bic2-1*. Po nahlídnutí do dostupných online zdrojů (signal.salk.edu a NASC) nebyla v žádném z nich registrována přítomnost další T-DNA inzerce v této linii. Navrhuji provedení segregací analýzy za účelem ověření přítomnosti potenciálně neregistrované T-DNA inzerce v linii *bic2-1*.

Hodnocená semena heterozygotní linie STUBL5-1/*stubl5-1* obsahovala 11,5 % abortovaných vajíček a 12 % abortovaných semen. Což opět nejsou zastoupení, která by byla očekávaná, kdyby mutace v genu STUBL5 způsobovala nesprávný vývoj vajíček či semen. Somatický fenotyp heterozygotních jedinců starých 4 týdny byl i v tomto případě výrazně potlačen a to nebývá u heterozygotů obvyklé. Stejně jako v předchozím případě je i v případě této heterozygotní linie možná přítomnost další neregistrované mutace a bylo by vhodné provést segregací analýzu.

Proteiny SYN2 a PANS1 patřily k nejslibnějším kandidátům. Ze semen linií *syn2-1* a *syn2-2* se nepodařilo získat žádné jedince. U linie *pans1-1* se nepodařilo včas selektovat homozygotní jedince. Semena heterozygotních jedinců byla uschována a jsou připravena k selekci homozygotů.

## 7 ZÁVĚR

Z původně sedmi kandidátních proteinů, které byly u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) identifikovány jako potenciální účastníci zapojující se do opravných drah poškození DNA a interagující s proteinem BCP1, byly proteiny XYL1 a STUBL5 vyloučeny.

U dvou heterozygotních mutantních linií, BIC2-1/*bic2-1* a STUBL5-1/*stubl5-1*, se ve stáří 4 týdnů vyskytl redukovaný somatický fenotyp v porovnání s wild-type linií. To může naznačovat existenci nových mutantů nesouvisejících s BCP1, kteří mohou být popsáni v budoucích testech.

## 8 LITERATURA

Abraham R. T. (2001): Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development* 17: 2177–2196.

Adachi S., Minamisawa K., Okushima Y., Inagaki S., Yoshiyama K., Kondou Y., Kaminuma E., Kawashima M., Toyoda T., Matsui M., Kurihara D., Matsunaga S., Umeda M. (2011): Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 10004–10009.

Alonso J. M., Stepanova A. N., Leisse T. J., Kim C. J., Chen H., Shinn P., Stevenson D. K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C. C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D. E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W. L., Berry C. C., Ecker J. R. (2003): Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653–657.

Andrews E. A., Paleček J., Sergeant J., Taylor E., Lehmann A. R., Watts F. Z. (2005): Nse2, a Component of the Smc5-6 Complex, Is a SUMO Ligase Required for the Response to DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology* 25: 185–196.

Berardini T. Z., Reiser L., Li D., Mezheritsky Y., Muller R., Strait E., Huala E. (2015): The *Arabidopsis* information resource: Making and mining the "gold standard" annotated reference plant genome. *Genesis* 53: 474–485.

Berdy J. (1980): Bleomycin-Type Antibiotics. In: Berdy J. (ed.): *Amino Acid and Peptide Antibiotics*, pp. 459–497, CRC Press, Boca Raton, FL.

Bork P., Hofmann K., Bucher P., Neuwald A. F., Altschul S. F., Koonin E. V. (1997): A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *The FASEB Journal* 11: 68–76.

Bosotti R., Isacchi A., Sonnhammer E. L. L. (2000): FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 225–227.

Boulton S. J. (2006): Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochemical Society Transactions* 34: 633–645.

Britt A. B. (2004): Repair of DNA Damage Induced by Solar UV. *Photosynthesis Research* 81: 105–112.

Cadet J., Douki T., Ravanat J. L. (2010): Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine* 49: 9–21.

Callebaut I., Mornon J. P. (1997): From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Letters* 400: 25–30.

Cobbe N., Heck M. M. S. (2000): Review: SMCs in the World of Chromosome Biology – From Prokaryotes to Higher Eukaryotes. *Journal of Structural Biology* 129: 123–143.

Cromer L., Jolivet S., Horlow C., Chelysheva L., Heyman J., De Jaeger G., Koncz C., De Veylder L., Mercier R. (2013): Centromeric Cohesion Is Protected Twice at Meiosis, by SHUGOSHINS at Anaphase I and by PATRONUS at Interkinesis. *Current Biology* 23: 2090–2099.

Cromer L., Jolivet S., Singh D. K., Berthier F., De Winne N., De Jaeger G., Komaki S., Prusicki M. A., Schnittger A., Guérois R., Mercier R. (2019): Patronus is the elusive plant securin, preventing chromosome separation by antagonizing separase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116: 16018–16027.

Culligan K. M., Tissier A., Britt A. B. (2004): ATR Regulates a G2-Phase Cell-Cycle Checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 16: 1091–1104.

da Costa-Nunes J. A., Capitão C., Kozak J., Costa-Nunes P., Ducasa G. M., Pontes O., Angelis K. J. (2014): The AtRAD21.1 and AtRAD21.3 *Arabidopsis* cohesins play a synergistic role in somatic DNA double strand break damage repair. *BMC Plant Biology* 14: 353.

Diaz I. (2018): Plant Defense Genes against Biotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 2446.

Díaz M., Pečinka A. (2018): Scaffolding for Repair: Understanding Molecular Functions of the SMC5/6 Complex. *Genes (Basel)* 9: 36.

Díaz M., Pečinková P., Nowicka A., Baroux C., Sakamoto T., Gandha P. Y., Jeřábková H., Matsunaga S., Grossniklaus U., Pečinka A. (2019): The SMC5/6 Complex Subunit NSE4A Is Involved in DNA Damage Repair and Seed Development. *The Plant Cell* 31: 1579–1597.

Dvořák Tomaščíková E., Procházková K., Yang F., Jemelková J., Finke A., Dorn A., Said M., Puchta H., Pečinka A. (2023): SMC5/6 complex-mediated SUMOylation stimulates DNA–protein cross-link repair in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 35: 1532–1547.

Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19: 1349.

Friesner J. D., Liu B., Culligan K. M., Britt A. B. (2005): Ionizing Radiation–dependent  $\gamma$ -H2AX Focus Formation Requires Ataxia Telangiectasia Mutated and Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related. *Molecular Biology of the Cell* 16: 2566–2576.

Fulcher N., Sablowski R. (2009): Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 20984–20988.

Furukawa T., Curtis M. J., Tominey C. M., Duong Y. H., Wilcox B. W. L., Aggoune D., Hays J. B., Britt A. B. (2010): A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA Repair* 9: 940–948.

Garcia V., Bruchet H., Camescasse D., Granier F., Bouchez D., Tissier A. (2003): AtATM Is Essential for Meiosis and the Somatic Response to DNA Damage in Plants. *The Plant Cell* 15: 119–132.

Haering C. H., Löwe J., Hochwagen A., Nasmyth K. (2002): Molecular Architecture of SMC Proteins and the Yeast Cohesin Complex. *Molecular Cell* 9: 773–788.

Harvey S. H., Krien M. J. E., O'Connell M. J. (2002): Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins, a family of conserved ATPases. *Genome Biology* 3.

Heitzeberg F., Chen I. P., Hartung F., Orel N., Angelis K. J., Puchta H. (2004): The Rad17 homologue of *Arabidopsis* is involved in the regulation of DNA damage repair and homologous recombination. *The Plant Journal* 38: 954–968.

Heyno E., Mary V., Schopfer P., Krieger-Liszkay A. (2011): Oxygen activation at the plasma membrane: Relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. *Planta* 234: 35–45.

Hirano T. (2005): Condensins: Organizing and Segregating the Genome. *Current Biology* 15: R265–R275.

Jensen M. K., Kjaersgaard T., Nielsen M. M., Galberg P., Petersen K., O'Shea C., Skriver K. (2010): The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure–function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemical Journal* 426: 183–196.

Kleinboelting N., Huep G., Kloetgen A., Viehoveer P., Weisshaar B. (2012): GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research* 40: D1211–D1215.

Küpper H., Andresen E. (2016): Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics* 8: 269–285.

Kurth E. G., Peremyslov V. V., Turner H. L., Makarova K. S., Iranzo J., Mekhedov S. L., Koonin E. V., Dolja V. V. (2017): Myosin-driven transport network in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: E1385–E1394.

Lafarge S., Montané M. H. (2003): Characterization of *Arabidopsis thaliana* ortholog of the human breast cancer susceptibility gene 1: AtBRCA1, strongly induced by gamma rays. *Nucleic Acids Research* 31: 1148–1155.

Lee J. H., Paull T. T. (2005): ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science* 308: 551–554.

Lehmann A. R. (2005): The role of SMC proteins in the responses to DNA damage. *DNA Repair* 4: 309–314.

Lempiäinen H., Halazonetis T. D. (2009): Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *The EMBO Journal* 28: 3067–3073.

Leung C. C. Y., Glover J. N. M. (2011): BRCT domains: easy as one, two, three. *Cell Cycle* 15: 2461–2470.

Lindahl T., Barnes D. E. (2000): Repair of Endogenous DNA Damage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 65: 127–134.

Liu Z., Hossain G. S., Islas-Osuna M. A., Mitchell D. L., Mount D. W. (2000): Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: *Arabidopsis* UVH1 DNA repair gene is a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad1. *The Plant Journal* 21: 519–528.

Lyu Y. L., Kerrigan J. E., Lin C. P., Azarova A. M., Tsai Y. C., Ban Y., Liu L. F. (2007): Topoisomerase II $\beta$ -Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane. *Cancer Research* 67: 8839–8846.

Manke I. A., Lowery D. M., Nguyen A., Yaffe M. B. (2003): BRCT Repeats As Phosphopeptide-Binding Modules Involved in Protein Targeting. *Science* 302: 636–639.

Manova V., Gruszka D. (2015): DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Frontiers in Plant Science* 6: 885.

Maréchal A., Zou L. (2013): DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9: a012716.

Mengiste T., Revenkova E., Bechtold N., Paszkowski J. (1999): An SMC-like protein is required for efficient homologous recombination in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 18: 4505–4512.

Mohammad D. H., Yaffe M. B. (2009): 14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response. *DNA Repair* 8: 1009–1017.

Murray J. M., Carr A. M. (2008): Smc5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 177–182.

Muslin A. J., Tanner J. W., Allen P. M., Shaw A. S. (1996): Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. *Cell* 84: 889–897.

Nasmyth K. (2002): Segregating Sister Genomes: The Molecular Biology of Chromosome Separation. *Science* 297: 559–565.

Paleček J., Vidot S., Feng M., Doherty A. J., Lehmann A. R. (2006): The Smc5-Smc6 DNA Repair Complex. *Journal of Biological Chemistry* 281: 36952–36959.

Pečinka A., Liu C. H. (2014): Drugs for Plant Chromosome and Chromatin Research. *Cytogenetic and Genome Research* 143: 51–59.

Preuss S. B., Britt A. B. (2003): A DNA-Damage-Induced Cell Cycle Checkpoint in *Arabidopsis*. *Genetics* 164: 323–334.

Procházková K., Finke A., Dvořák Tomaščíková E., Filo J., Bente H., Dvořák P., Ovečka M., Šamaj J., Pečinka A. (2022): Zebularine induces enzymatic DNA–protein crosslinks in 45S rDNA heterochromatin of *Arabidopsis* nuclei. *Nucleic Acids Research* 50: 244–258.

Puchta H. (2005): The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany* 56: 1–14.

Reidt W., Wurz R., Wanieck K., Chu H. H., Puchta H. (2006): A homologue of the breast cancer-associated gene BARD1 is involved in DNA repair in plants. *The EMBO Journal* 25: 4326–4337.

Ricaud L., Proux C., Renou J. P., Pichon O., Fochesato S., Ortet P., Montané M. H. (2007): ATM-Mediated Transcriptional and Developmental Responses to  $\gamma$ -rays in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 2: e430.

Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S., Bonner W. M. (1998): DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *Journal of Biological Chemistry* 273: 5858–5868.



Savic V., Yin B., Maas N. L., Bredemeyer A. L., Carpenter A. C., Helmink B. A., Yang-Iott K. S., Sleckman B. P., Bassing C. H. (2009): Formation of Dynamic  $\gamma$ -H2AX Domains along Broken DNA Strands Is Distinctly Regulated by ATM and MDC1 and Dependent upon H2AX Densities in Chromatin. *Molecular Cell* 34: 298–310.

Sechet J., Frey A., Effroy-Cuzzi D., Berger A., Perreau F., Cueff G., Charif D., Rajjou L., Mouille G., North H. M., Marion-Poll A. (2016): Xyloglucan Metabolism Differentially Impacts the Cell Wall Characteristics of the Endosperm and Embryo during *Arabidopsis* Seed Germination. *Plant Physiology*. 170: 1367–1380.

Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessaraki M. (2012): Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012: 1–26.

Shigeyama T., Watanabe A., Tokuchi K., Toh S., Sakurai N., Shibuya N., Kawakami N. (2016):  $\alpha$ -Xylosidase plays essential roles in xyloglucan remodelling, maintenance of cell wall integrity, and seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 67: 5615–5629.

Siaud N., Dray E., Gy I., Gérard E., Takvorian N., Doutriaux M. P. (2004): Brca2 is involved in meiosis in *Arabidopsis thaliana* as suggested by its interaction with Dmc1. *The EMBO Journal* 23: 1392–1401.

Singh D. K., Spillane C., Siddiqi I. (2015): PATRONUS1 is expressed in meiotic prophase I to regulate centromeric cohesion in *Arabidopsis* and shows synthetic lethality with OSD1. *BMC Plant Biology* 15: 201.

Sweeney P. R., Britt A. B., Culligan K. M. (2009): The *Arabidopsis* ATRIP ortholog is required for a programmed response to replication inhibitors. *The Plant Journal* 60: 518–526.

Takahashi N., Ogita N., Takahashi T., Taniguchi S., Tanaka M., Seki M., Umeda M. (2019): A regulatory module controlling stress-induced cell cycle arrest in *Arabidopsis*. *eLife* 8: e43944.

Tateda C., Watanabe K., Kusano T., Takahashi Y. (2011): Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 62: 4773–4785.

Tomasz M., Lipman R., Chowdary D., Pawlak J., Verdine G. L., Nakanishi K. (1987): Isolation and Structure of a Covalent Cross-Link Adduct Between Mitomycin C and DNA. *Science* 235: 1204–1208.

Trapp O., Seeliger K., Puchta H. (2011): Homologs of Breast Cancer Genes in Plants. *Frontiers in Plant Science* 2: 19.

Tuteja N., Gill S. S., Tuteja R. (2011): Plant Responses to Abiotic Stresses: Shedding Light on Salt, Drought, Cold and Heavy Metal Stress. In: Tuteja N., Gill S. S., Tuteja R. (eds.): *Omics and Plant Abiotic Stress Tolerance*, pp. 39–64, Bentham Science Publishers.

Ueda K., Komano T. (1984): Sequence-specific DNA damage induced by reduced mitomycin C and 7-N-(p-hydroxyphenyl)mitomycin C. *Nucleic Acids Research* 12: 6673–6683.

Vladejić J., Yang F., Dvořák Tomašítková E., Doležel J., Paleček J., Pečinka A. (2022): Analysis of BRCT5 domain-containing proteins reveals a new component of DNA damage repair in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 13: 1023358.

Wang H., Zhao Q., Chen F., Wang M., Dixon R. A. (2011): NAC domain function and transcriptional control of a secondary cell wall master switch. *The Plant Journal* 68: 1104–1114.

Watanabe K., Pacher M., Dukowic S., Schubert V., Puchta H., Schubert I. (2009): The STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 5/6 Complex Promotes Sister Chromatid Alignment and Homologous Recombination after DNA Damage in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 21: 2688–2699.

Whalen J. M., Dhingra N., Wei L., Zhao X., Freudenreich C. H. (2020): Relocation of Collapsed Forks to the Nuclear Pore Complex Depends on Sumoylation of DNA Repair Proteins and Permits Rad51 Association. *Cell Reports* 31: 107635.

Wu L. C., Wang Z. W., Tsan J. T., Spillman M. A., Phung A., Xu X. L., Yang M. C. W., Hwang L. Y., Bowcock A. M., Baer R. (1996): Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nature Genetics* 14: 430–440.

Wu N., Yu H. (2012): The Smc complexes in DNA damage response. *Cell & Bioscience* 2: 5.

Yaffe M. B., Rittinger K., Volinia S., Caron P. R., Aitken A., Leffers H., Gamblin S. J., Smerdon S. J., Cantley L. C. (1997): The Structural Basis for 14-3-3: Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell* 91: 961–971.

Yan S., Wang W., Marqués J., Mohan R., Saleh A., Durrant W. E., Song J., Dong X. (2013): Salicylic Acid Activates DNA Damage Responses to Potentiate Plant Immunity. *Molecular Cell* 52: 602–610.

Yang X. Y., Chen Z. W., Xu T., Qu Z., Pan X. D., Qin X. H., Ren D. T., Liu G. Q. (2011): *Arabidopsis* Kinesin KP1 Specifically Interacts with VDAC3, a Mitochondrial Protein, and Regulates Respiration during Seed Germination at Low Temperature. *The Plant Cell* 23: 1093–1106.

Yoshiyama K. O. (2015): SOG1: a master regulator of the DNA damage response in plants. *Genes & Genetic Systems* 90: 209–216.

Yoshiyama K., Conklin P. A., Huefner N. D., Britt A. B. (2009): Suppressor of gamma response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12843–12848.

Yoshiyama K., Kobayashi J., Ogita N., Ueda M., Kimura S., Maki H., Umeda M. (2013a): ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO reports* 14: 817–822.

Yoshiyama K., Sakaguchi K., Kimura S. (2013b): DNA Damage Response in Plants: Conserved and Variable Response Compared to Animals. *Biology* 2: 1338–1356.

Yu C., Hou L., Huang Y., Cui X., Xu S., Wang L., Yan S. (2023): The multi-BRCT domain protein DDRM2 promotes the recruitment of RAD51 to DNA damage sites to facilitate homologous recombination. *New Phytologist* 238: 1073–1084.

Yu X., Chini C. C. S., He M., Mer G., Chen J. (2003): The BRCT Domain Is a Phospho-Protein Binding Domain. *Science* 302: 639–642.

Zamariola L., De Storme N., Vannerum K., Vandepoele K., Armstrong S. J., Franklin F. C. H., Geelen D. (2014): SHUGOSHINs and PATRONUS protect meiotic centromere cohesion in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 77: 782–794.

Zhu T., Nevo E., Sun D., A Peng J. (2012): Phylogenetic analyses unravel the evolutionary history of NAC proteins in plants. *Evolution* 66: 1833–1848.

## 9 PŘÍLOHY

**Příloha 1:** Poloha T-DNA inzertů v genech daných mutantních linií huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Černý trojúhelník značí T-DNA inzerci. Fialově jsou značeny UTR oblasti genu, oranžově jsou značeny kódující oblasti genu, plnou čarou jsou značeny exony, přerušovanou čarou jsou značeny introny. Směr šipky značí směr 5'-3'. Data potřebná k vytvoření byla získána z The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR; Berardini a kol., 2015) a ze signal.salk.edu.

