

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

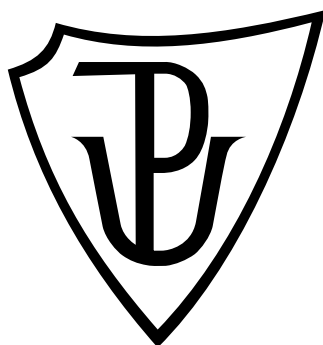
Olomouc 2021

Bc. Jitka Jemelková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Funkční charakterizace genů zapojených
v opravách DNA-proteinových komplexů
u huseníčku rolního**

Bc. Jitka Jemelková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: doc. Mgr. Aleš Pečinka, Ph.D.

Podklad pro zadání DIPLOMOVÉ práce studenta

Jméno a příjmení: **Jitka JEMELKOVÁ**
Osobní číslo: **R190612**
Adresa: **Karla Vyrstřčila 383, Slavičín, 76321 Slavičín, Česká republika**
Téma práce: **Funkční charakterizace genů zapojených v opravě DNA-proteinových komplexů u huseníčku rolního**
Téma práce anglicky: **Functional characterization of genes involved in DNA-protein-crosslinks repair in Arabidopsis thaliana**
Vedoucí práce: **Mgr. Aleš Pečinka, Ph.D.**
Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování:

1. Analýza genů podílejících se na opravě DNA-proteinových komplexů za užití genetické analýzy (křížení, komplementace), molekulárně biologické charakterizace (izolace DNA a RNA, sekvenování, PCR, reverzní transkripce, kvantitativní PCR).
2. Genetický skrínink a funkční analýza genů (selektce homozygotních mutantů a validace kandidátních genů).
3. Resekvenování a ověřování smc6b kandidátů.
4. Ověření mutace v genu *TEB1CHI* a jeho funkční analýza.
5. Vytvoření nových mapovacích populací u kandidátních linií.
6. Vyhodnocení experimentálních výsledků.

Seznam doporučené literatury:

1. Stingle J, Jentsch S. DNA-protein crosslink repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(8):455-760.
2. Diaz M, Pecinka A. Scaffolding for Repair: Understanding Molecular Functions of the SMCS5/6 Complex. *Genes (Basel).* 2018;9(1):36.
3. Liu C, Finke A, Diaz M, Rozhon W, Poppenberger B, Baubec T, Pecinka A. Repair of DNA damage induced by the cytidine analog zebularine requires ATR and ATM in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2015; 27(6):1788-1800).
4. Maple J, Moller SG. Mutagenesis in Arabidopsis. *Methods Mol Biol.* 2007;362:197-206.

Podpis vedoucího práce:



Datum: 30. 10. 19

Podpis vedoucího pracoviště:



Datum: 01-11-2019

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Jitka Jemelková

Název práce: Funkční charakterizace genů zapojených v opravách DNA-proteinových komplexů u huseníčku rolního

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Ústav experimentální botaniky, v.v.i., Akademie věd ČR, Olomouc

Vedoucí práce: doc. Mgr. Aleš Pečinka, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2021

Abstrakt:

DNA reparační dráhy jsou důležitým mechanismem udržující genomickou stabilitu. Řada mechanismů poškození DNA a jejich reparace byla v minulosti již popsána. Doposud méně probádaná je reparace DNA-proteinových komplexů.

Diplomová práce se zabývá studiem genů, jejichž produkty se účastní reparace DNA proteinových komplexů indukovaných zebularinem. Cytidinový analog zebularin se do DNA začleňuje během procesu replikace a vytváří DNA-proteinové komplexy tím, že kovalentně váže DNA-metyltransferázu 1.

Výzkum využívá strategii dopředné genetiky a je postaven na náhodné mutagenезi populace huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) alkylačním činidlem ethylmetan sulfonátem a následné identifikaci zasažených genů. Mezi identifikované geny můžeme zařadit *STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 6B*, jež je součástí SMC5/6 komplexu, ale také gen *TEBICHI* kódující DNA polymerázu s helikázovou aktivitou.

Cílem práce bylo identifikovat mutace v těchto genech a popsat jejich dopad na proteinovou sekvenci. Následně pomocí molekulárně biologických a genetických analýz zjistit, jakou roli mohou zastávat funkční proteiny při opravách DNA-proteinových komplexů. *TEBICHI* a *SMC6B* jsou prostředníky rozdílných reparačních drah. *SMC6B* je podjednotka *SMC5/6* komplexu, který podporuje homologní rekombinaci, zatímto *TEBICHI* je součástí reparace známé jako mikrohomologií zprostředkované spojování konců. Diplomová práce potvrzuje, že oprava DNA-proteinových komplexů není závislá na jedné reparační dráze, ale využívá více reparačních mechanismů.

Klíčová slova: DNA-proteinový komplex, zebularin, SMC5/6 komplex, SMC6B, *TEBICHI*

Počet stran: xiv + 88

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Jitka Jemelková

Title: Functional characterization of genes involved in DNA-protein-crosslinks repair in *Arabidopsis thaliana*

Type of thesis: Master

Department: Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Olomouc

Supervisor: doc. Mgr. Aleš Pečinka, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Abstract:

DNA repair pathways represent important mechanisms that maintain genomic stability. Many DNA damages and their repair have been described to date. The repair of DNA-protein crosslinks is yet to be widely explored.

The master thesis is focused on analyzing genes which are involved in the repair of DNA-protein crosslinks induced by zebularine. Zebularine is a cytidine analog which is incorporated into DNA during strand synthesis in DNA replication where zebularine induces DNA-protein crosslinks by covalently trapping DNA-methyltransferase 1.

The study of these genes is based on a strategy of forward genetics. Random mutagenesis of population of *Arabidopsis thaliana* by alkylating agent ethyl methane-sulfonate and following identification of affected genes are used.

Among the studied genes involved in the repair of DNA-protein complexes, SMC6B is contained which is classified as a subunit of the SMC5/6 complex but also a gene encoding DNA polymerase with helicase activity called TEBICHI.

The aim of the study was to identify mutations in these genes and describe their impact on the protein sequence. Subsequently, we used molecular biological and genetic analyses to determine the role that functional proteins may play in the repair of DNA-protein complexes. TEBICHI and SMC6B are mediators of different repair pathways. SMC6B promotes repair by homologous recombination, whereas TEBICHI is part of a repair known as microhomology-mediated end joining. The diploma thesis confirms that the repair of DNA-protein complexes does not depend on the only one repair pathway but uses multiple repair mechanisms.

Keywords: DNA-protein complex, zebularine, SMC5/6 complex, SMC6B, TEBICHI

Number of pages: xiv + 88

Language: Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Funkční charakterizace genů zapojených v opravách DNA-proteinových komplexů u huseníčku rolního, *Arabidopsis thaliana*, zpracovala samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů a pod vedením doc. Mgr. Aleše Pečinky, Ph.D.

V Olomouci dne: 27. 4. 2021

.....

Jemelková Jitka

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat doc. Mgr. Aleši Pečinkovi Ph.D. a Mgr. Evě Dvořák Tomaštkové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, spolupráci, ale hlavně za bohaté zkušenosti, které jsem díky nim během svého působení na Ústavu experimentální botaniky v.v.i. AV ČR v Olomouci mohla načerpat. Zároveň chci poděkovat celému kolektivu za vytvoření přátelského prostředí. Poděkování patří také mé rodině, přátelům a partnerovi, kteří mě při mém studiu neustále podporovali.

OBSAH

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	viii
SEZNAM OBRÁZKŮ	xi
SEZNAM TABULEK.....	xiii
1 ÚVOD.....	1
2 CÍLE PRÁCE.....	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1 Poškození a reparace DNA	3
3.2 DNA-proteinové komplexy a jejich klasifikace.....	5
3.2.1 Analogy cytidinu jako inhibitory DNA-metyltransferáz.....	6
3.2.2 Analogy cytidinu jako induktory poškození DNA.....	7
3.2.3 Reparace DPCs typu 1	8
3.3 Výzkum DNA-proteinových komplexů indukovaných zebularinem.....	10
3.3.1 Předcházející výzkum	12
3.3.2 Charakterizace SMC5/6 komplexu	13
3.3.2.1 Architektura a dynamika SMC5/6 komplexu.....	14
3.3.2.2 Zapojení SMC5/6 komplexu v opravách DNA.....	17
3.3.3 Charakterizace genu <i>TEBICHI</i>	18
3.3.3.1 Molekulární a genetická analýza genu <i>TEBICHI</i> u rostlin.....	19
3.3.3.2 Mikrohomologií zprostředkované spojování konců.....	21
4 MATERIÁL A METODY	23
4.1 Biologický materiál.....	23
4.2 Použité chemikálie, soupravy, oligonukleotidy a roztoky	25
4.2.1 Seznam chemikálií	25
4.2.2 Seznam chemických souprav	26
4.2.3 Seznam oligonukleotidů.....	26
4.2.4 Použité roztoky.....	28
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	30
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	31
4.4.1 Sterilizace semen.....	31
4.4.2 Testování senzitivity na chemikáliích.....	31
4.4.3 Hybridizační a komplementační křížení	31
4.4.4 Analýza buněčné smrti v kořenovém meristému	33
4.4.5 Izolace DNA.....	34
4.4.5.1 Upravený protokol Edwardse.....	34
4.4.5.2 Kolonková izolace NucleoSpin Plant II.....	35

4.4.6	Izolace RNA a syntéza cDNA.....	35
4.4.7	Polymerázové řetězové reakce.....	36
4.4.7.1	Konvenční polymerázová řetězová reakce.....	36
4.4.7.2	Inverzní polymerázová řetězová reakce.....	37
4.4.8	Genotypizace.....	40
4.4.8.1	Genotypizace T-DNA linií, reportérových linií a linie <i>teb-1</i> pomocí metody PCR	40
4.4.8.2	Genotypizace DPCR kandidáta 9B-43 pomocí CAPS markeru.....	43
5	VÝSLEDKY	44
5.1	Kandidátní linie s mutací v genu <i>SMC6B</i>	44
5.1.1	Komplementační křížení	44
5.1.2	Ověření mutace linie 6A-10	45
5.1.3	Ověření mutace u linií 9A-10, 9A-30, 9A-32 a 17A-26	48
5.1.4	Testování senzitivity linií 6-10, 9A-30 a <i>smc6b-1</i> vůči zebularinu	51
5.2	Kandidátní linie s mutací v genu <i>TEBICHI</i>	54
5.2.1	Selekce homozygotních mutantů 9B-43 pomocí CAPS markeru	54
5.2.2	Ověření mutace 9B-43 komplementačním křížením.....	55
5.2.3	Ověření mutace 9B-43 PCR amplifikací a sekvenováním.....	55
5.2.4	Testování senzitivity linií 9B-43 a <i>teb-1</i> na chemikáliích.....	56
5.2.5	Analýza buněčné smrti v kořenovém meristému linií 9B-43 a <i>teb-1</i>	58
5.2.6	Tvorba dvojitých mutantních linií a jejich selekce	60
5.2.7	Analýza linie <i>teb-1 fan1-1</i>	62
6	DISKUSE.....	65
7	ZÁVĚR	70
8	LITERATURA.....	72
9	PŘÍLOHY	Chyba! Záložka není definována.

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATM	ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED kináza
ATP	Adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
ATR	ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD-3 RELATED kináza
ASAP1	ARABIDOPSIS SNI1 ASSOCIATED PROTEIN 1 (možný ortolog NSE5 u huseníčku rolního)
BER	Bázová excizní reparace
BLEO	Bleomycin
cDNA	Kódující DNA
CL	Crosslink
Col-0	Referenční linie Columbia-0 huseníčku rolního
CPT	Camptothecin
CtIP	C-terminální interakční protein (C-terminal interacting protein), mediátor MRN komplexu
DCK	Cytidin-deoxycytidinkináza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA-metyltransferáza
dNTP	Deoxynukleotid trifosfát (deoxynucleoside triphosphate)
DPC	DNA-proteinový komplex (DNA-protein crosslink)
DSB	Dvouvláknový zlom (double-strand break)
EMS	Ethylmetan sulfonát
EtOH	Ethanol
FAN1	Fanconi/FANCD2 asociovaná nukleáza 1
HPY2	HIGH PLOIDY 2 (NSE2)
HR	Homologní rekombinace
ICRF	Dextrazoxan; 4,4'-(1,2-dimetyl-1,2-ethanediyl)-bis-2,6-piperazinedion
KITE	Kleisin-Interacting Tandem winged-helix Elementy (NSE1 a NSE3)
LIG	Ligáza

MAGE	MELANOMA-ASSOCIATED ANTIGEN
MMC	Mitomycin C
MMEJ	Mikrohologní spojování konců (microhomology-mediated end joining)
MMS	Metylmethan sulfonát
MSS21	METHYLMETHANSULFONATE SENSITIVE 21 (NSE2)
MMR	Mismatch reparace
MRE11	Meiotický rekombinační faktor 11, součástí komplexu MRN
MRN	MRE11-RAD50-NBS1 komplex
MS	Murashige a Skoog médium
MUS81	MMS AND UV SENSITIVE 81 endonukleáza
NBS1	Nijmegen breakage syndrome protein 1, součástí komplexu MRN
NER	Nukleotidová excizní reparace
NHEJ	Nehomologní spojování konců (non-homologous end joining)
NSE	Non-SMC elementy
PARP1	Poly(ADP-ribóza)-polymeráza 1
PCR	Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
POL	Polymeráza
QC	Označení pro skupinu buněk s nízkou mitotickou aktivitou (klidové centrum) v kořenovém apikálním meristému (quiescent center)
RAD	Reparační a rekombinační proteiny, replikační faktory
RAM	Kořenový apikální meristém (root apical meristem)
RFB	Bariéra replikační vidlice (replication fork barrier)
RNA	Ribonukleová kyselina
RNR	Ribonukleotid-reduktáza
RPA	Replikační protein A
SAM	S-adenosyl-methionin
SDSA	Syntézově závislé spojování řetězců (synthesis-dependent strand annealing)
SLF1,2	SMC5/6 komplex lokalizační faktory 1,2

SMC	STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES
SNI1	SUPRESSOR OF NPR1-1, INDUCIBLE 1 (možný ortolog proteinu NSE6 u huseníčku rolního)
SSA	Spojování jednovláknových řetězců (single strand annealing)
SSB	Jednovláknový zlom (single-strand break)
SUMO	SMALL UBIQUITIN RELATED MODIFIER
UTR	Nepřekládané oblasti (untranslated regions)
T-DNA	Transferová DNA, vnášená Agrobacteriem do hostitelského genomu
TDP1	TYROSYL-DNA FOSFODIESTERÁZA 1 (TYROSYL-DNA PHOSPHODIESTERASE 1)
TEB	TEBICHI, DNA polymeráza s helikázovou aktivitou
TOP 1, 2	Topoizomeráza 1, 2
UV	Ultrafialové záření
WSS1A	WEAK SUPPRESSOR OF <i>SMT3</i> 1A proteáza (DNA-dependentní metaloproteáza), homolog SPARTAN
WT	Standardní forma (wild type)
XPF/ERCC1	Xeroderma pigmentosum complementation group F/ DNA excision repair protein, strukturně specifický nukleázový komplex
ZEB	Zebularin
5-azaC	5-azacytidin
5-azadC	2'-deoxy-5-azacytidin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schématické znázornění poškození DNA	4
Obrázek 2: Klasifikace DPCs (typy 1-4) podle vazby na DNA.....	6
Obrázek 3: Strukturní srovnání cytidinu a zebularinu	7
Obrázek 4: Specializované mechanismy reparace DPCs u huseníčku rolního	9
Obrázek 5: Diagram SHORE mapování	11
Obrázek 6: Dvojití mutanti – Vyřazení dvou reparačních drah	12
Obrázek 7: Stuktura SMC proteinu.....	14
Obrázek 8: Interakce NSE4 proteinu s jeho vazebnými partnery	16
Obrázek 9: Schematické znázornění dynamiky SMC5/6 komplexu během ATPázového cyklu	16
Obrázek 10: Architektura SMC5/6 komplexu kvasinek, rostlin a člověka.....	17
Obrázek 11: (A) Struktura genu <i>TEB</i> a lokalizace mutantních alel. (B) Morfologické fenotypy listové růžice mutantních linií <i>teb</i>	20
Obrázek 12: Mechanismus MMEJ v lidských buňkách.....	22
Obrázek 13: Princip komplementačního a hybridizačního křížení	32
Obrázek 14: Architektura kořenového meristému	33
Obrázek 15: Princip inverzní PCR.....	38
Obrázek 16: Genotypizace linie <i>teb-1</i>	41
Obrázek 17: Očekávané výsledky gelové elektroforézy po restrikci enzymem <i>Eco130I</i>	43
Obrázek 18: Komplementační křížení kandidátní linie 6-10	44
Obrázek 19: Komplementační křížení kandidátních linií s mutací v genu <i>SMC6B</i>	45
Obrázek 20: Amplifikace úseku genu <i>SMC6B</i> linie 6-10 s pravděpodobným výskytem mutace	46
Obrázek 21: Mutace v gDNA linie 6-10.....	46
Obrázek 22: Delece cDNA linie 6-10	47
Obrázek 23: Změna v aminokyselinové sekvenci výsledného <i>SMC6B</i> proteinu linie 6-10.....	47
Obrázek 24: Predikce sekundární struktury <i>SMC6B</i>	48
Obrázek 25: Amplifikace genu <i>SMC6B</i>	48
Obrázek 26: Amplifikace problematické oblasti genu <i>SMC6B</i>	49
Obrázek 27: Restrikční místa endonukleázy <i>XmnI</i> a <i>Eco130I</i> v genu <i>SMC6B</i>	49
Obrázek 28: Produkty inverzní PCR.....	50
Obrázek 29: Sekvenční analýza PCR produktu kandidátních linií.....	50
Obrázek 30: PCR amplifikace gDNA s primerem spadajícím do translokované oblasti.....	51
Obrázek 31: Sekvenční analýza potvrzující chromozomovou přestavbu u kandidátních linií.....	51
Obrázek 32: Testování senzitivity linií <i>smc6b</i> vůči zebularinu	52
Obrázek 33: Selektce homozygotních mutantů 9B-43 pomocí CAPS markeru.....	54

Obrázek 34: Komplementační křížení linie 9B-43	55
Obrázek 35: Amplifikace úseku genu TEBICHI linie 9B-43 s výskytem mutace.....	56
Obrázek 36: Potvrzení mutace linie 9B-43 Sangerovým sekvenováním	56
Obrázek 37: Změna v aminokyselinové sekvenci výsledného TEB proteinu linie 9B-43.....	56
Obrázek 38: Testování senzitivity linií 9B-43 a <i>teb-1</i> na vybraných chemikáliích	57
Obrázek 39: Analýza buněčné smrti v kořenovém meristému linií 9B-43 a <i>teb-1</i>	59
Obrázek 40: Genotypizace <i>teb1 fan1-1</i>	61
Obrázek 41: Genotypizace <i>teb-1 smc6b-1</i>	61
Obrázek 42: Genotypizace <i>teb-1 mus81-1</i>	61
Obrázek 43: Testování senzitivity linií <i>fan1-1</i> , <i>teb-1</i> a dvojitě mutantní linie <i>teb-1 fan1-1</i> na MMC	62
Obrázek 44: Analýza buněčné smrti v kořenovém meristému u linie <i>teb-1 fan1-1</i>	63
Obrázek 45: Model poškození způsobený zebularinem a jeho reparace.....	65
Obrázek 46: Reparace DNA-proteinových komplexů dráhou MMEJ	68

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam rostlinných linií	23
Tabulka 2: Růstové podmínky	24
Tabulka 3: Seznam použitých oligonukleotidů.....	26
Tabulka 4: Syntéza cDNA	35
Tabulka 5: Složení PCR reakční směsi	36
Tabulka 6: Podmínky PCR	37
Tabulka 7: Digesce gDNA enzymem <i>Xmn</i> I (NEB)	38
Tabulka 8: Digesce gDNA enzymem <i>Eco</i> 130I (Thermo Fisher Scientific)	39
Tabulka 9: Složení ligační směsi.....	39
Tabulka 10: Složení reakční směsi pro inverzní PCR.....	39
Tabulka 11: Podmínky inverzní PCR	40
Tabulka 12: Genotypizace T-DNA a reportérových linií.....	41
Tabulka 13: Genotypizace linie <i>teb-1</i>	42
Tabulka 14: Složení PCR reakční směsi pro genotypizaci T-DNA linií a linie <i>teb-1</i>	42
Tabulka 15: Podmínky PCR pro genotypizaci T-DNA linií a linie <i>teb-1</i>	42
Tabulka 16: Složení reakční směsi pro restrikci	43
Tabulka 17: Genotypizace <i>teb-1 fan1-1</i>	60

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Průměrné délky kořínků testovaných <i>smc6b</i> linií na zebularinu.....	52
Graf 2: Poměr délek kořínků zebularin/mock u <i>smc6b</i> linií.....	53
Graf 3: Průměrné délky kořínků testovaných <i>teb</i> linií na chemikáliích.....	57
Graf 4: Poměr délek kořínků chemikálie/mock u <i>teb</i> linií.....	57
Graf 5: Průměrné délky kořínků testovaných linií na $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC.....	62
Graf 6: Poměr délek kořínků MMC/mock u testovaných linií.....	63

1 ÚVOD

Metylace DNA představuje důležitou epigenetickou modifikaci, během níž dochází k přenosu metylové skupiny z donorové molekuly SAM (S-adenosyl-methionin) na 5' pozici aromatického řetězce cytosinu. Metylace je katalyzována enzymy zvanými DNA metyltransferázy. U rostlin je tato modifikace důležitá především pro potlačení exprese repetitivních sekvencí a transpozonů, odvozeně pak i pro regulaci exprese specifických genů.

Metylační úroveň v buňkách snižují inhibitory DNA-methyltransferáz, mezi které se řadí i zebularin. Jedná se o cytidinový analog, který se začleňuje do DNA během procesu replikace. Po začlenění do molekuly DNA je schopen kovalentně vázat DNA-methyltransferázu a za vzniku stabilního DNA-proteinového komplexu. Vytvořené DNA-proteinové komplexy jsou pro buňky více toxické než hypometylační účinky zebularinu, jelikož zabraňují replikaci či transkripci a v buňkách dochází k aktivaci specifické reparační odpovědi. Vzhledem k tomu, že účinky zebularinu silně interferují s replikací DNA, nedochází k tvorbě nových vláken a dělení buněk. U mutantních rostlinných linií rostoucích na médiu v přítomnosti zebularinu lze pozorovat různé buněčné a molekulární fenotypy, které napomáhají zkoumat mechanismus reparace DNA-proteinových komplexů.

2 CÍLE PRÁCE

Tato práce vychází z poznatků o účincích cytidinového analogu zebularinu (Champion et al., 2010; Liu et al., 2015) a navazuje již na předchozí práce (Kruska, 2017; Jemelková 2019). Výzkum je zaměřen na analýzu genů zapojených v opravách DNA-proteinových komplexů indukovaných zebularinem, konkrétně na *SMC6B* a *TEBICHI*. Pro zpracování diplomové práce byly vytyčeny tyto cíle:

- Genetický skrínink a funkční analýza genů (selekce homozygotních mutantů a validace kandidátních genů).
- Resekvenování a ověřování mutací v kandidátním genu *SMC6B*.
- Ověření mutace v genu *TEBICHI*.
- Analýza vybraných genů podílejících se na opravě DNA-proteinových komplexů za užití genetické analýzy (křížení, komplementace), molekulárně biologické charakterizace (izolace DNA a RNA, sekvenování, PCR, reverzní transkripce, kvantitativní PCR).
- Vytvoření nových mapovacích populací u kandidátních linií
- Vyhodnocení experimentálních výsledků.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Poškození a reparace DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) představuje základní genetickou jednotku každé buňky, její integrita a stabilita je nezbytná pro buněčný život. Jakékoliv poškození, které není opraveno reparačními procesy, dává možnost vzniku mutace. K poškozením DNA, zapříčiněnými jak exogenními, tak endogenními vlivy, nedochází zřídka, nýbrž až tisíckrát denně (Lindahl, 1993). Poškození ovlivňují nejen samotnou kódující informaci, ale také průběh relikace či transkripce (Friedberg et al., 1995). V současné době jsou zkoumána různá poškození DNA a jejich specifické reparační mechanismy zajišťující genomovou stabilitu.

Exogenně na DNA působí řada fyzikálních a chemických mutagenů. Mezi fyzikální mutageny lze zařadit neionizující UV-B záření (280–320 nm) vytvářející kovalentní vazby mezi sousedními pyrimidinovými (cytosinovými a thyminovými) bázemi (tzv. pyrimidinové dimery) (Grossman et al., 1988; Reef et al., 2009). Za přítomnosti UV-A (320–400 nm) a světelného (400–700 nm) záření jsou pyrimidinové dimery opravovány DNA-fotolyázami procesem zvaným „fotoreaktivace“. Fotolyáza nejprve detekuje místo poškození, na které se poté váže. Světelná energie je využívána pro oxidaci cyklobutanové kostry, při čemž konvertují dimery na monomery (Brettel et Byrdin, 2010). Proces fotoreaktivace byl popsán u prokaryot, nižších eukaryot, rostlin, u placentálních savců však tento mechanismus chybí. U nich jsou pyrimidinové dimery opravovány odstraněním poškozené báze (BER), nukleotidu (NER) či pomocí mismatch reparace (MMR) nezávisle na světelných podmínkách (Thoma, 1999).

Nebezpečí pro buňky představuje také ionizující záření ($\lambda < 10$ nm). Energie ionizujícího záření je pohlcována vodou, což zapříčiňuje tvorbu reaktivních volných radikálů, které mohou reagovat s DNA za vzniku mnoha aduktů. Důsledkem není jen poškození bází, ale převážně jednovláknové (SSBs) a dvouvláknové zlomy (DSBs) (Leadon, 1996; Tripathy et Oelmüller, 2012; Hu et al., 2016). Mechanismus reparace SSBs a DSBs se liší. SSBs využívá nukleotidovou excizní opravu (NER) či mismatch reparaci (MMR), zatímco oprava DSBs je zprostředkována homologní rekombinací (HR) či nehomologním spojováním konců (NHEJ) (Sargent et al., 1997; Puchta, 2005). V hypoxické oblasti buněk pak indukuje ionizující záření především DNA proteinové crosslinky (Stingele et Jentsch, 2015).

Působením chemických alkylačních činidel, jako je ethylmetan sulfonát (EMS) či metylmetan sulfonát (MMS), dochází k tranzici (záměna purinových bází, nebo pyrimidinových bází) a transverzi (záměna purinových za pyrimidinové a naopak) (Maple et Møller, 2007). Tranzice i transverze jsou nejčastěji opravovány pomocí bázové excizní reparace (BER) (Krokan et Bjørås, 2013). Pokud dojde na takto pozměněné sekvenci k DNA replikaci, může být změna zafixována a předávána dále jako mutace. Díky mutagenním vlastnostem nachází alkylační

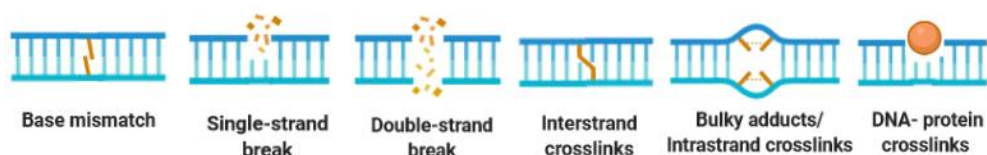
činnidla uplatnění při tvorbě mutagenizovaných populací, které se využívají pro potřeby genetického skrínování (Kim et al., 2006).

Vyjmenovaná poškození však nemusí být zapříčiněna jen účinkem exogenních vlivů. Řada z nich je i endogenního původu. Mezi hydrolytická poškození se řadí depurinace či depyrimidinace, při nichž dochází k rozrušení glykosidické vazby mezi purinovými či pyrimidinovými bázemi a deoxyribózou. Následkem je ztráta bází a vznik abazických míst tzv. „abasic site“ (Lindahl, 1993). Oprava hydrolytických poškození je zajištěna BER či NER (Lindahl, 1993; Naegeli, 1997; Swenberg et al., 2011).

DNA je rovněž náchylná k oxidaci. Nejběžnější bázovou modifikací je oxidace guaninu na 8-oxo-guanin, který má schopnost párovat se s adeninem (Lindahl, 1993). Tato modifikace s mutagenním potenciálem je generována endogenními reaktivními kyslíkovými radikály, ale může vznikat i spontánně během aerobního metabolismu (Kamiya, 2004).

Typickým poškozením jsou také DNA crosslinky, které vznikají spojením dvou nukleotidových zbytků na jednom řetězci (intrastrand) nebo mezi dvěma řetězci (interstrand). Reparace intrastrand crosslinků je zprostředkována NER, zatímco interstrand crosslinky jsou opravovány zejména HR nebo NHEJ (Huang et Li, 2013).

Velká pozornost je v současné době věnována protinádorovým preparátům, jejichž mechanismus účinku je založen na cíleném poškození DNA, inhibici replikace či mitózy a apoptóze nádorové buňky. Řadí se sem inhibitory Topoizomeráz 1 (deriváty camptotecinu) a 2 (etoposid), cisplatina mající podobný účinek jako alkylační činidla, antibiotika (mitomycin C, bleomycin), analogy bází (zebularin, 5-azacytidin a 2'-deoxy-5-azacytidin) a mnohá další (Espinosa et al., 2003). Řada chemoterapeutik stojí za vznikem kovalentní vazby mezi proteinem a DNA, tvoří tzv. DNA-proteinové komplexy (DPCs). Vzniklé adukty jsou velké a blokují procesy spojené s chromatinem – transkripci, odvíjení DNA i samotnou replikaci. Inhibice opravných drah DPCs nabízí nový přístup pro kombinovanou protinádorovou terapii (Stingle et al., 2017). Vzhledem k tomu, že výzkum mé diplomové práce je zaměřen na reparaci DPCs, bude toto poškození popsáno podrobněji v samostatné kapitole.



Obrázek 1: Schématické znázornění poškození DNA

V molekule DNA může dojít k chybnému párování či záměně bází. Častá poškození DNA představují jednovláknové (SSBs) či dvouvláknové zlomy (DSBs). DNA-DNA komplexy vznikají kovalentním spojením dvou nukleotidových zbytků na jednom řetězci (intrastrand CL) nebo mezi dvěma řetězci (interstrand CL). Pokud dojde ke kovalentnímu navázání proteinu či enzymu na molekulu DNA, dochází ke vzniku DNA-proteinového komplexu. Schéma vytvořeno v online aplikaci Biorender.

3.2 DNA-proteinové komplexy a jejich klasifikace

Molekula DNA přichází neustále do kontaktu s širokou řadou proteinů, avšak vazba mezi nimi je zpravidla reverzibilní a po vykonané akci jsou proteiny z molekuly DNA disociovány. Tím jsou vlákna DNA zpřístupněna pro kompakci ve formě nukleozomů, replikaci, transkripci i pro opravné mechanismy. Pokud jsou buňky vystaveny činidlům poškozujícím DNA, může dojít ke kovalentnímu navázání proteinů na molekulu DNA za vzniku toxických DNA-proteinových komplexů (DNA-protein crosslinks, DPCs) (Ide et al., 2015).

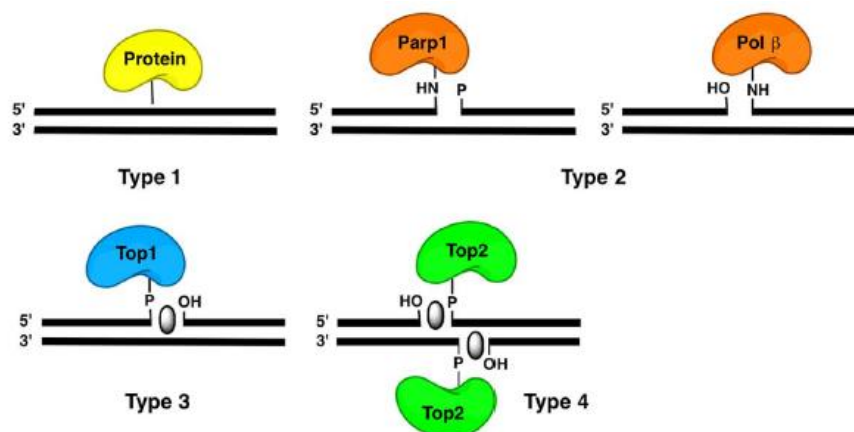
Podle povahy zachyceného proteinu mohou být DPCs enzymatické vyznačující se kovalentní vazbou mezi specifickým enzymem a DNA, či neenzymatické, přičemž se na DNA zachytí jakýkoliv protein nacházející se v její blízkosti (Stingelet al., 2015).

DPCs se odlišují svou velikostí i fyzikálně chemickými vlastnostmi. Jednotlivé DPCs lze rozdělit dle místa jejich vzniku a vazby na čtyři odlišné typy. DPC typu 1 (viz Obrázek 2) nejsou asociovány se zlomy DNA, protein se spojuje s neporušeným řetězcem. Běžně jsou tyto DPCs vyvolány účinností formaldehydu, sloučeninami platiny, ale pravděpodobně také analogy cytidinu, jako jsou 5-azacytidin a zebularin (Hacker et al., 2020).

DPCs typu 2, 3 a 4 jsou pouze enzymatického charakteru. Při neúspěšné báze excizní reparaci (BER) opravující SSBs může dojít k zachycení Poly(ADP-riboza)-polymerázy 1 (PARP1) či DNA-polymerázy β (POL β). Tyto proteinové adukty vzniklé vedle apurinových míst jsou zařazovány pod DPCs typu 2 (Quiñones et al., 2015; Nakano et al., 2017; Ide et al., 2018).

DPCs typu 3 jsou spojeny s Topoizomerázou 1 (TOP1), která za běžných podmínek uvolňuje torzní pnutí štěpem jednoho vlákna DNA. TOP1 se váže na 3' konec SSBs pomocí tyrosyl-fosfodiesterové vazby, zatímco 5' konec s OH skupinou je volný a má možnost rotovat kolem druhého neporušeného vlákna. Po uvolnění torzního pnutí je obvykle TOP1 z molekuly DNA uvolněna. Působením inhibitorů TOP1 (deriváty camptothecinu) dochází ke kovalentnímu přichycení TOP1 na DNA, čímž vzniká DPCs (Pommier et Marchand, 2012; Stingelet al., 2017).

Na vzniku DPCs typu 4 se podílí Topoizomeráza 2 (TOP2), která indukuje dvouvláknové štěpy. Zachycená TOP2 je spojena s DNA prostřednictvím dvou tyrosyl-fosfodiesterových vazeb na 5' koncích DSBs. DPCs typu 4 představují závažnější poškození než DPCs typu 3 (Wang, 1996; Hacker et al., 2020).



Obrázek 2: Klasifikace DPCs (typy 1-4) podle vazby na DNA

DPCs typu 1 (Type 1) tvoří proteiny, které jsou kovalentně připojeny na nepoškozenou DNA. DPCs typu 2 (Type 2) vznikají neúspěšnou opravou BER, přičemž se na molekule DNA kovalentně zachytí PARP1 či POL β . Typ 3 (Type 3) DPCs představuje TOP1 připojenou na 3' konec SSB DNA přes jednu tyrosyl-fosfodiesterovou vazbu. DPCs typu 4 (Type 4) se tvoří připojením TOP2 ke dvěma 5' koncům DSB DNA prostřednictvím dvou tyrosyl-fosfodiesterových vazeb (Ide et al., 2015; Nakano et al., 2017).

3.2.1 Analogy cytidinu jako inhibitory DNA-metyltransferáz

Metylace cytosinu je u rostlin nezbytnou epigenetickou modifikací, která je katalyzována enzymy zvanými DNA metyltransferázy. DNA metyltransferázy přenáší metylovou skupinu z donorové molekuly SAM (S-adenosyl-methionin) na 5' pozici cytosinu (Robertson, 2001). U rostlin dochází k metylaci ve všech sekvenčních kontextech (CG, CHG a CHH, kde H zastupuje všechny báze kromě G) (Feng et al., 2010; Zhang et al., 2018). Regulační oblasti genů jsou buď v metylovaném nebo demetylovaném stavu, přičemž každý stav má jiný biologický efekt a vliv na expresi. Metylace je spojována s heterochromatinem, který je více kompaktní, a tedy obtížněji přístupný pro transkripční mašinerii. V metylovaných oblastech dochází ke ztrátě genové exprese (Robertson, 2001; McMahon et al., 2017; Zhang et al., 2018).

Aberantní metylace hraje velkou roli během procesu karcinogeneze (Bird, 2002; Jones et Baylin, 2002). Hypermetylace promotorů genů pro tumorové supresory způsobuje jejich transkripční represi a naopak dává prostor pro onkogenní transformaci (Baylin et Herman, 2000; Whitman et al., 2008).

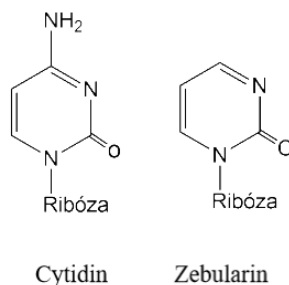
Jeden z novodobých přístupů léčby karcinogeneze spočívá v inhibici DNA metyltransferáz, což umožňuje opětovnou reaktivaci umlčených genů. Mezi inhibitory metylace DNA se řadí analogy cytidinu – 5-azacytidin (5-azaC), 2'-deoxy-5-azacytidin (5-azadC), ale také zebularin (Jones et Baylin, 2002; Dote, 2005). Tyto látky mají rozdílný biologický poločas, pro 5-azaC se udává 4 hodiny, zatímco biologický poločas zebularinu je až 3 týdny (Champion et al., 2010; Pecinka et Liu, 2014). Kromě toho 5-azaC a 5-azadC vykazují značnou toxicitu a nestabilitu ve vodních roztocích na rozdíl od zebularinu, který je pro svou menší toxicitu a větší stabilitu ve vodném roztoku více preferovaným cytidinovým analogem (Constantinides et al., 1977; Beisler, 1978; Cheng et al., 2003).

3.2.2 Analogy cytidinu jako induktory poškození DNA

Champion et al. (2010) zkoumali *in vitro* kovalentní zasíťování bakteriální DNA-metyltransferázy pomocí molekul DNA obsahující cytidinový analog zebularin za vzniku DNA-proteinových komplexů (DPCs) (Champion et al., 2010). Orta et al. (2013) ve studii využívali buněčné linie z vaječníků čínského křečka roustoucích na Petriho miskách s cytidinovými analogy. V buňkách docházelo nejen ke snížení úrovně metylace záchytem DNA-metyltransferázy, ale vzniklé proteinové adukty se jevily pro buňky jako vysoce toxické. DPCs představují fyzickou bariéru pro většinu enzymů, které se pohybují podél vlákna DNA (Orta et al., 2013).

Analogy cytidinu se vyskytují ve formě tzv. proléčiv či prekurzorů a oproti původnímu cytidinu se liší svou strukturou. Aby došlo k jejich začlenění do molekuly DNA, musí být fosforylovány a redukovány za vzniku aktivní formy trifosfát-deoxycytidinu. Konverze se účastní ribonukleotid-reduktáza (RNR) a cytidin-deoxycytidinkináza (DCK), přičemž RNR hraje roli při přeměně ribonukleotidu na deoxyribonukleotid a DCK je zodpovědná za fosforylaci (Lim et al., 2011).

Do molekuly DNA jsou cytidinové analogy začleňovány během S fáze buněčného cyklu. Mohou se tedy pravděpodobně začlenit jak do nově syntetizovaných řetězců DNA, tak i do RNA primerů Okazakiho fragmentů (Liu et al., 2015). Strukturální porovnání cytidinu a zebularinu je zobrazeno na Obrázku 3.



Obrázek 3: Strukturální srovnání cytidinu a zebularinu

Zebularin se od cytidinu liší nepřítomností 4' aminoskupiny. Začleněním zebularinu do molekuly DNA dochází ke snížení úrovně metylace kovalentní vazbou s DNA-metyltransferázami za vzniku DPCs.

Výzkumy provedené na modelovém organismu huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) prokázaly, že zebularin v buňkách spouští specifickou reparační odpověď nezávisle na měnící se úrovni metylace. Zebularinem indukované poškození tedy pro buňku představuje větší riziko než hypometylační účinky a buňka se vůči tomuto poškození snaží bránit. Signalizace poškození je zprostředkována ATR a ATM kinázami v replikační fázi buněčného cyklu. ATR a ATM kinázy fosforylují histonovou variantu H2AX nacházející se v chromatinu v místě poškození. Tato fosforylace indukuje akumulaci dalších proteinů, které se podílejí na reparační odpovědi (Amiard et al., 2011). Z výzkumu rovněž vyplývá, že důležitou roli v opravě zebularinem indukovaného

poškození zaujímá komplex strukturní údržby chromosomů Structural maintenance of chromosomes 5/6 (SMC5/6) (Liu et al., 2015).

Vzhledem k tomu, že účinky zebularinu silně interferují s replikací DNA, nedochází k tvorbě nových vláken a dělení buněk. U mutantních rostlinných linií rostoucích na médiu v přítomnosti zebularinu lze pozorovat různé buněčné a molekulární fenotypy, které napomáhají zkoumat mechanismus reparace (Liu et al., 2015).

3.2.3 Reparace DPCs typu 1

V posledních letech bylo získáno mnoho poznatků týkajících se opravy DPCs u kvasinek či savců (Ide et al., 2015; Stinglee et Jentsch, 2015). V současné době je na vzestupu i výzkum mechanismu opravy DPCs u rostlin (Liu et al., 2015; Enderle et al., 2019a; Hacker et al., 2020).

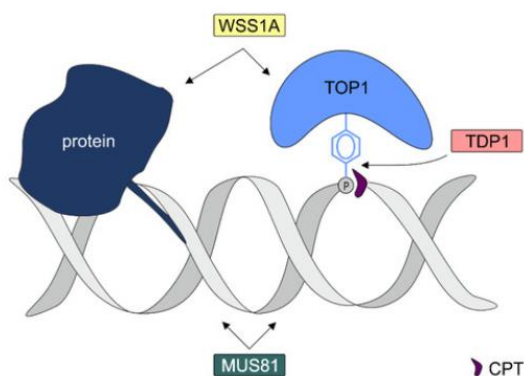
DPCs jsou v buňkách opravovány jak kanonickými opravnými dráhami, tak i specializovanými mechanismy (Enderle et al., 2019b). Pro kvasinky a bakterie je nepostradatelný mechanismus NER opravující DPC typu I (<16 kDa) před samotnou replikací DNA (Nakano et al., 2007; de Graaf et al., 2009). Mechanismus NER byl popsán také u savců, navázaný protein však nesměl přesáhnout velikost 11 kDa (Nakano et al., 2007).

Pro objasnění reparačního mechanismu u huseníčku rolního byly využity linie nesoucí mutace v genech, jejichž produkty jsou zapojeny ve specifických opravných dráhách. Gen *XPF* kóduje endonukleázu, která je nezbytná při opravě NER (Gaillard et Wood, 2001; Dubest et al., 2002). Rostlinny *xpf* byly dle očekávání hypersenzitivní v přítomnosti MMC, avšak v přítomnosti zebularinu byla senzitivita těchto rostlin nižší. Z toho vyplývá, že NER má při opravách poškození způsobených zebularinem minoritní roli (Liu et al., 2015). Stejně nízká senzitivita byla prokázána i u *rad5a-2* rostlin, čímž bylo vyloučeno, že zebularin ovlivňuje regresi replikační vidličky (Heyer et al., 2010; Liu et al., 2015).

Důležitým reparačním mechanismem opravujícím DPCs během S nebo G2 fáze je také HR (Nakano et al., 2007; Vaz et al., 2017). HR mutantů kvasinek i rostlin ve výzkumech vykazovali zvýšenou senzitivitu vůči crosslinkujícím činidlům jako je formaldehyd, 5-azaC či ZEB (de Graaf et al., 2009; Liu et al., 2015). Působení formaldehydu je však spojováno také s tvorbou DNA-DNA crosslinků a 5-azaC s indukcí SSBs (Liu et al., 2015; Vaz et al., 2017). Spojitost mezi HR a DPCs typu 1 indukovanými formaldehydem a 5-azaC je tedy nadále podmětem pro další výzkum. Nicméně bylo potvrzeno, že při opravě zebularinem indukovaných DPCs je HR stěžejním opravným mechanismem (Liu et al., 2015).

Kromě těchto kanonických cest existuje u rostlin i řada specializovaných enzymů, které se podílí na opravách DPCs typu 1. Endonukleáza MUS81 (MMS AND UV SENSITIVE 81 endonukleáza) štěpí DNA v blízkosti DPCs, proteáza WSS1A (WEAK SUPPRESSOR OF *SMT3* 1A) degraduje proteinovou část DPCs. Tyrosyl-DNA-fosfodiesteráza 1 (TDP1) umožňuje

hydrolýzu vazby mezi proteinem a DNA, přičemž se podílí především na reparaci DPCs typu 3 (Enderle et al., 2019b).



Obrázek 4: Specializované mechanismy reparace DPCs u huseníčku rolního

Huseníček rolní využívá při opravě DPCs specializované mechanismy. DPCs mohou být opraveny proteolytickou degradací, jíž se účastní proteáza WSS1A, či pomocí endonukleolytického štěpení pomocí endonukleázy MUS81. Enzymatické DPCs, jako jsou TOP1-DNA-komplexy vzniklé účinkem camptothecinu, lze opravit hydrolýzou tyrosyl-fosfodiesterové vazby pomocí TDP1 (Enderle et al., 2019a).

MUS81 patří do rodiny XPF/MUS81 endonukleáz a je rozšířena napříč eukaryontními organismy (Interthal et Heyer, 2000). Při výzkumu bylo zjištěno, že rostliny *mus81* vykazují senzitivitu vůči crosslinkujícím činidlům, jako je MMC a cisplatina (Mannuss et al., 2010; Enderle et al., 2019a). MUS81 se účastní reparace DPCs typu 1 a 3. Patrně však nevytváří zářez na vlákne DNA, které je zesíťováno, nýbrž na opačném vlákne DNA, a to nejčastěji naproti již existujícímu zářezu, čímž vzniká DSB, který je opraven kanonickými dráhami (Regairaz et al., 2011).

Další endonukleázou zapojenou do reparace DPCs je MRE11, která je součástí konzervovaného komplexu MRN. Kromě MRE11 se komplex MRN skládá z rekombinázy RAD50 a signálního transdukčního proteinu NBS1 (Williams et al., 2007). MRN komplex je zapojený v opravách DSBs a jeho role při reparaci DPCs je stále předmětem výzkumu. Mutantní kvasinkové linie *mre11* vykazovaly při výzkumu senzitivitu vůči formaldehydu, etoposidu i camptothecinu (de Graaf et al., 2009; Stinglee et al., 2017). MRE11 patrně vytváří zářez na komplementárním řetězci naproti generovanému SSB stejně jako MUS81. Vzniklé DSBs jsou opravovány opět kanonickými reparačními dráhami. Vzhledem k tomu, že reparace MRN komplexem probíhá nezávisle na kovalentně vázaném proteinu, je možné, že se podílí na opravách všech typů DPCs (Stinglee et al., 2017).

Proteáza WSS1 degradující proteiny kovalentně navázané na DNA byla objevena relativně nedávno (Stinglee et al., 2014). WSS1 byla identifikována u kvasinek s deficitem TDP1, čímž se dostala do popředí její nenahraditelná funkce. Bylo prokázáno, že WSS1 specificky degraduje proteinovou část DPCs. Patrně je schopna opravovat DPCs typu 1, 3 a 4 (Stinglee et al., 2014; Serbyn et al., 2020). U živočichů tuto funkci plní proteáza Spartan (SPRTN/DVC1) (Stinglee et

al., 2015). Proteázy z rodiny SPRTN/WSS1 jsou kontrolovány několika mechanismy. Jedním z nich je deubikvitinace SPRTN/WSS1 doposud neznámým mechanismem umožňujícím lokalizaci na chromatin (Stingele et al., 2016). Po proteolýze DPC zůstává na DNA navázaný malý peptid, který již nepřekáží, případně se uvažuje, že může být opraven NER (Stingele et al., 2017). Huseníček rolní obsahuje dva homology WSS1A a WSS1B, avšak pouze u WSS1A byl prokázán podíl na opravách DPC a funkce WSS1B zatím nebyla objasněna. Mutantní linie *Atwss1* vykazují na cisplatině či camptothecinu defektní fenotyp vyznačující se krátkou délkou kořene ve srovnání s WT a zvýšeným počtem mrtvých buněk v kořenovém meristému (Enderle et al., 2019b).

TDP1 je spojována převážně s opravou DPCs typu 3, avšak pro úplnost zahrnu v diplomové práci i tento princip opravy (Pommier et al., 2006; Prasad et al., 2019). TDP1 hydrolyticky štěpí vazbu mezi DNA a proteinem. Mechanismus účinnosti byl detailněji popsán u kvasinek (Murai et al., 2012). TDP1 hydrolyzuje fosfodiesterovou vazbu mezi pentózafosfátovou kostrou DNA a tyrozylovým zbytkem TOP1 (Pouliot et al., 1999). Na 3' konci DNA zůstává navázaný fosfát, který je dále odstraněn fosfatázou. SSB je následně opraven BER (Plo, 2003). Výzkumy se snažily objasnit funkci TDP1 i u rostlin. Mutantní linie *tdp1* huseníčku rolního se však po působení crosslinkujících činidel nelišila od WT, avšak v kombinaci s mutantními liniemi *wss1* či *mus81* vykazovali dvojití mutanti silnější defektní fenotyp. U těchto dvojitých mutantů došlo k nárůstu mrtvých buněk v kořenovém meristému při vystavení camptothecinu. Z výsledků vyplývá, že TDP1 je vysoce specializovanou reparační dráhou DPCs (Enderle et al., 2019b).

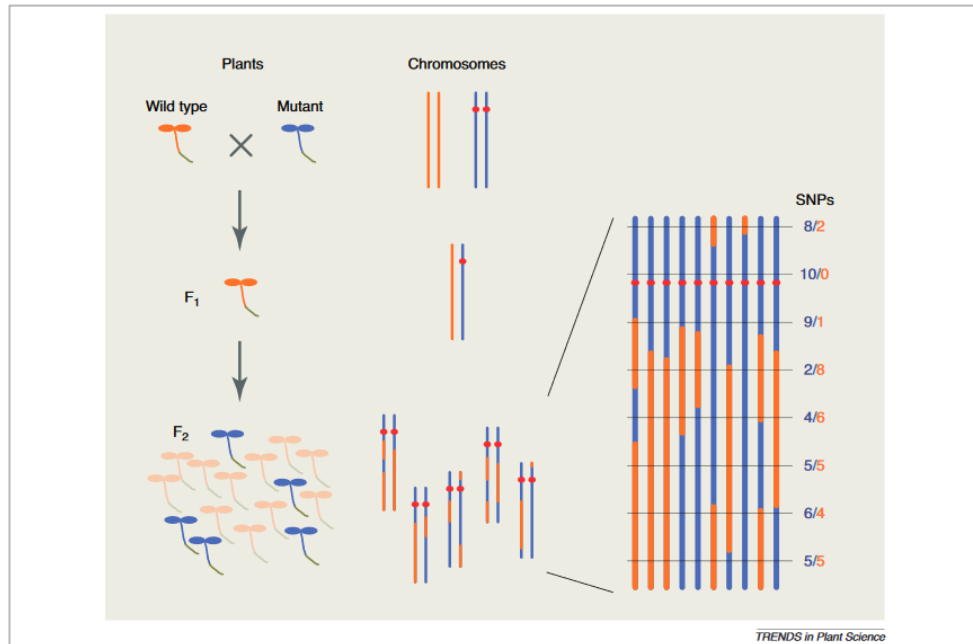
3.3 Výzkum DNA-proteinových komplexů indukovaných zebularinem

Přestože se výzkum opravy DPC typu 1 posunuje neustále kupředu, stále je otázkou, jaké reparační dráhy se do celého procesu zapojují, a které proteiny je tvoří. Výzkum pod vedením doc. Mgr. Aleše Pečinky Ph.D. je zaměřen na reparaci DPCs indukovaných zebularinem. Ve studii pracujeme s EMS mutagenizovanou populací huseníčku rolního, u níž hledáme mutace v genech, jejichž produkty se účastní jednotlivých reparačních drah (strategie dopředné genetiky). Mutantní rostlinné linie lze fenotypově odlišit na růstovém médiu se zebularinem – jsou vůči zebularinu senzitivní, menší a jejich kořeny dosahují maximálně 40% délky než na kontrolním médiu.

Po objevu zájmového fenotypu je třeba identifikovat zasažený gen (geny), jenž se na výsledném fenotypu podílí, určit mutaci a popsat alelické vztahy. Po tyto účely se využívají testy na alelismus, segregáční analýzy, analýzy reciprokého křížení a mapování pomocí sekvenování (SHORE mapování) (Schneeberger et al., 2009; Schneeberger et Weigel, 2011; Galvão et al., 2012; Sun et Schneeberger, 2015).

Během SHORE mapování se mutantní rostliny kříží s nemutantní rostlinou stejného genotypu a následná generace se samospráší. Rekombinantní F₂ populace následně nese

segregující fenotyp – jedinci s mutantním fenotypem jsou z této populace izolováni a celogenomově sekvenováni. Během sekvenační analýzy dochází k porovnání polymorfních markerů rodičovských alel a stanovuje se chromozomální oblast, která obsahuje kandidátní kauzální mutace, které jsou poté ověřovány pomocí komplementačních testů (Sun et Schneeberger, 2015).



Obrázek 5: Diagram SHORE mapování

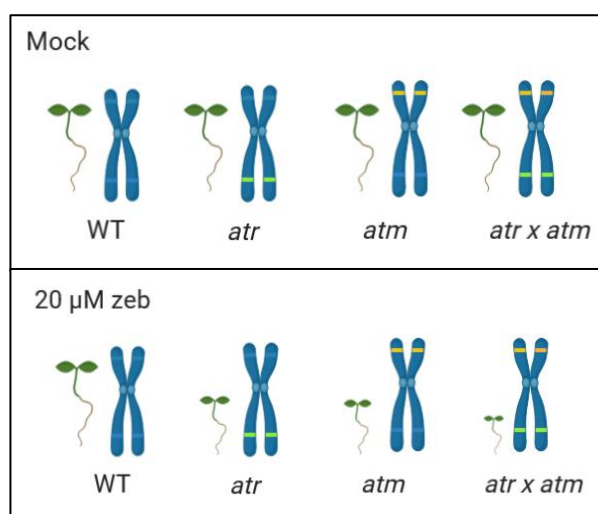
V F₂ mapovací populaci generované zpětným křížením s nemutagenizovaným jedincem dochází k segregaci mutantního fenotypu. Tito jedinci jsou izolováni a sekvenováni. Porovnáním polymorfismů mezi dvěma rodičovskými alelami dochází k určení chromozomové oblasti s možným vyskytem kauzální mutace (Schneeberger et Weigel, 2011).

Nicméně reparační systém je složitý a oportunistický. Pokud jedna reparační dráha nefuguje, může oprava alespoň částečně probíhat pomocí jiné reparační dráhy. Cíleně proto vnášíme do mutantní homozygotní rostliny hybridizačním křížením mutaci jiného genu a sledujeme jejich společný fenotypový účinek. Při tomto procesu dochází k vyřazení dvou genů zároveň, přičemž mohou spadat do stejné reparační dráhy, ale také do dvou rozdílných reparačních drah.

Pokud dojde k vyřazení dvou genů jedné reparační dráhy, nemá obvykle toto vyřazení na senzitivitu vliv – stále je ovlivněna pouze jedna reparační dráha a senzitivita rostlin zůstává na stejné hladině. Naopak u linií, u nichž došlo k vyřazení dvou genů, jenž spadají do dvou reparačních drah (*atm atr*), mají tato vyřazení aditivní účinek a rostliny se stávají vůči zebularinu hypersenzitivními.

Mutantní linie *atm* a *atr* vykazují na médiu s 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZEB určitou senzitivitu. Jejich kořeny jsou oproti kontrolní linii W35 značně menší. Jak je známo, ATM hraje roli převážně v opravě dvouvláknových zlomů DNA, zatímco ATR je přítomna při opravách poškození na replikačních vidličkách v průběhu replikace, kde se nachází jednovláknové zlomy (Cimprich *et*

Cortez, 2008; Liu *et al.*, 2015). U dvojitých mutantů *atm atr* tak došlo k vyřazení dvou reparačních drah a rostliny se staly hypersenzitivními vůči zebularinu (Liu *et al.*, 2015).



Obrázek 6: Dvojití mutanti – Vyřazení dvou reparačních drah

Schématické znázornění fenotypového projevu dvojitého mutanta, u něhož došlo k vyřazení dvou reparačních drah. Rostlinná linie WT nenes v genech *ATR* a *ATM* mutaci. Mutantní alela *atr* je značena zeleně, mutantní alela *atm* žlutě. Při růstu na kontrolním růstovém médiu dosahují jednoduché mutantní linie i dvojitý mutant stejné délky, jako kontrolní linie. 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZEB působí jako induktor poškození, což se projevuje na fenotypech mutantních linií, u nichž došlo k vyřazení potřebných genů pro reparaci. Po vyřazení jednoho genu se inaktivuje jedna reparační dráha a rostliny jsou vůči interní kontrole menší. Po vyřazení dvou genů z odlišných reparačních drah se vyřadí obě tyto reparační dráhy, dvojití mutanti se vyznačují vyšší hypersenzitivitou vůči zebularinu než jednoduší mutanti (Schéma dle výsledků Liu *et al.*, 2015, vytvořeno v online aplikaci BioRender).

3.3.1 Předcházející výzkum

Genetický skrínink započal Dr. Andreas Finke (Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Colegne, Německo) mutagenizací 10 000 semen linie W35 (Col-0) činidlem EMS způsobující ethylaci v pozici N⁷- nebo O⁶- na guaninu. Mutagenizovaná semena byla zaseta do zeminy a sloužila pro další reprodukci a získání M₂ generace semen, u nichž se předpokládal výskyt mutací v homozygotním stavu.

Při genetickém skríninku bylo sesbíráno 108 skupin semen M₂, z nichž tři skupiny (9A, 9B a 10A) byly použity pro můj výzkum v rámci bakalářské práce (Jemelková, 2019). Z každé skupiny bylo vyseto ~1200 semen na médium obsahující 7,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularin. Po týdnu byl pozorován u vyklíčených rostlin značný rozdíl v délce jejich kořínků. Rostliny s malými kořínky byly selektovány na 1/2 MS médium.

Z každé skupiny bylo selektováno přibližně 80 rostlin, avšak účinky zebularinu byly pro některé z nich fatální a po přesazení do média či zeminy uhynuly. Z vitálních rostlin byla následně získána sbírka semen (M₃ generace) sloužící pro ověření kandidátů a další selekci na 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinu. Sbírkky byly označeny čísly dle rostlin (semena první rostliny ze skupiny 9A získala označení 9A-1).

Při následné selekci byly vyčleněny linie, které byly vůči zebularinu (i) nesenzitivní – délky kořínků na kontrolním médiu a na médiu se zebularinem byly stejné (falešně pozitivní kandidát); (ii) vývojoví mutanti mající malé kořínky nezávisle na inhibitoru; (iii) senzitivní linie – na zebularinu měly rostliny krátké kořínky, kdežto na kontrolním médiu měly kořínky dlouhé. Zásadním výstupem této analýzy pro každou rostlinou linií byl poměr průměrných délek kořínku na zebularinu a na kontrolním médiu. Tento parametr umožňoval porovnání všech kandidátních linií s kontrolními liniemi (W35 a *smc6b-1*). Za senzitivní kandidáty byly považovány rostliny, u nichž délka kořínku na zebularinu dosáhla méně než 40 % délky na kontrolním médiu.

Kandidátní linie 9A-10, 9A-30 a 9A-32 vykazovaly při tomto selektivním testu na 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinu stejný fenotyp jako pozitivní kontrolní linie *smc6b-1* (Jemelková, 2019). Mutace v genu *SMC6B* byla u těchto linií potvrzena pomocí komplementačního křížení. Avšak ověření přítomnosti mutace pomocí sekvenování nebylo úspěšné. Oblast mezi exonem 17. až 20. nebylo možné PCR naamplifikovat. V rámci diplomové práce jsem se rozhodla ve výzkumu pokračovat s cílem ověřit přítomnost mutace v genu *SMC6B* u vybraných kandidátních linií.

Kandidátní linie s neznámou mutací byly kříženy s linií W35 pro získání hybridní mapovací F_2 populace. V získané F_2 populaci došlo k segregaci mutantního fenotypu (SHORE mapování). Segregující rostliny byly izolovány a následně celogenomově sekvenovány. Pomocí bioinformatických analýz provedených Mgr. Klárou Procházkovou a Mgr. Martinem Kovačikem byly u těchto linií dle skóre vyčleněny mutace genů, které se mohou podílet na opravách DNA-proteinových komplexů. U linie 9B-43 byla nalezena mutace v genu *TEBICHI*, jejímž ověřením se rovněž zabývám ve své diplomové práci.

3.3.2 Charakterizace SMC5/6 komplexu

Chromatin tvořící eukaryontní jaderný genom je během buněčných procesů dynamicky remodelován (Alabert et Groth, 2012). Nezbytnou roli při těchto procesech zastávají tzv. SMC komplexy (STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES): kohezin tvořený SMC1 a SMC3 podjednotkami, kondenzin tvořený SMC2 a SMC4 podjednotkami a SMC5/6 komplex (Jeppsson et al., 2014). Kohezin umožňuje párování sesterských chromatid a tento stav udržuje až do anafáze buněčného cyklu (Uhlmann et al., 1999; Losada et al., 2000). Kondenzin se podílí na kondenzaci mitotických chromozomů během interfáze. Kompaktní struktura chromozomů je pro jaderné dělení nezbytná (Hirano et Mitchison, 1994; Hirano et al., 1997).

SMC5/6 komplex je konzervován napříč eukaryontními organismy. Jeho biologická funkce není zcela přesně definována. Během S fáze buněčného cyklu usnadňuje průběh replikace a podporuje stabilitu replikační vidličky (Irmisch et al., 2009; Peng et al., 2018). U mutantních *smc5/6* kvasinek bylo zjištěno, že oblasti DNA obsahující repetice, jako jsou lokusy rDNA a telomery, nebyly úspěšně replikovány, přičemž neúplné a aberantní replikace vedly až

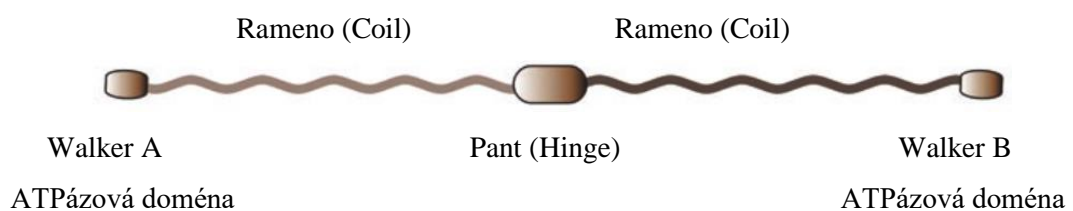
k chromozomálním zlomům (Torres-Rosell et al., 2005; Bermudez-Lopez et al., 2010; Chavez et al., 2010).

Ve studiích na lidských buňkách bylo zjištěno, že SMC5/6 komplex je asociován s chromatinem během interfáze, ale během mitózy dochází k jeho disociaci (Taylor et al., 2001; Gallego-Paez et al., 2014). Malá množství SMC5/6 komplexu byla pozorována i na mitotických chromozomech, avšak nepředpokládá se, že by detekované množství mělo účinek na jejich sestavení. Odstranění SMC5 a SMC6 podjednotek vedlo k deformaci sesterských chromatid, hyperkondenzaci distálních ramen a hypokondenzaci centromer. Tyto aberace potvrzují souvislost s funkcí komplexu při replikaci a remodelaci chromatinu. Bez komplexu se chromozomální segregace stává defektní a dochází k prolínání sesterských chromatid (Gallego-Paez et al., 2014).

Studium SMC5/6 komplexu u huseníčku potvrzuje jeho zapojení v opravách DNA (Mengiste, 1999; Watanabe et al., 2009; Díaz et al., 2019). SMC5/6 komplex se také podílí na regulaci správného vývoje rostlin, reaguje na abiotický stres, ovlivňuje sexuální reprodukci a potlačuje autoimunitní reakce (Diaz et Pecinka, 2018).

3.3.2.1 Architektura a dynamika SMC5/6 komplexu

SMC podjednotky jsou charakteristické svou podobnou doménovou strukturou. Každá SMC podjednotka se skládá z pantové domény (hinge) nacházející se uprostřed aminokyselinové sekvence, dvou terminálních hlavových domén s ATPázovou aktivitou a dvou ramenových částí, tzv. coil spojujících hlavové domény s pantem. Proteiny SMC vytváří dimery spojením svých pantových domén, které představují kostru celého komplexu. Hlavové terminální domény se skládají ze dvou motivů Walker A a Walker B, které umožňují navázání molekuly ATP. Po navázání dvou molekul ATP dochází k dimerizaci ATPázových domén (Fousteri, 2000; Nasmyth et Haering, 2005; Hirano, 2006; Palecek et al., 2006).



Obrázek 7: Struktura SMC proteinu

SMC proteiny mají konzervované doménové struktury. V centrální oblasti se nachází pant (Hinge), jež je ohraničen dvěma rameny (Coil) ukončenými hlavovými doménami s ATPázovou aktivitou tvořenými motivy Walker A (N-terminální doména) a Walker B (C-terminální doména) (Carter et Sjögren, 2012).

Podjednotky SMC5 a SMC6 dále interagují s nejméně šesti NSE (NON-SMC-ELEMENT) podjednotkami, které vytváří odlišné subkomplexy: NSE2-SMC5-SMC6, NSE1-NSE3-NSE4 a NSE5-NSE6. Přestože SMC5/6 komplex má u různých organismů stejnou či podobnou stavbu,

nomenklatura jeho podjednotek se liší, v některých případech jsou jednotlivé podjednotky kódovány dvěma paralogními geny (Diaz et Pecinka, 2018).

Podjednotky NSE1, NSE3 a NSE4 tvoří stabilní subkomplex, který se specificky váže na SMC5/6 komplex (Duan et al., 2009; Hudson et al., 2011). Paleček et al. (2006) uvádí, že SMC5 a SMC6 podjednotky jsou spojeny kleisinovým proteinem NSE4. Kleisinová molekula zároveň stimuluje hydrolýzu ATP (Fousteri, 2000; Vondrova et al., 2019). U huseníčku byly nalezeny dva paralogní geny kódující NSE4A a NSE4B proteiny, jenž interagují s SMC5/6 komplexem (Díaz et al., 2019). Díaz et al. (2019) udávají, že NSE4A je zapojen do oprav somatického poškození DNA u huseníčku rolního a zároveň se podílí na vývoji semen. Silná mutace NSE4A je pro huseníček letální (Díaz, 2018, Díaz et al., 2019).

NSE1 obsahuje RING motiv ve své C-terminální části, jež je charakteristický pro E3-ubikvitin ligázy. Sama o sobě je ubikvitin ligázová aktivita NSE1 v lidském SMC5/6 komplexu slabá, avšak v přítomnosti NSE3/MAGEG1 proteinu dochází k jejímu zesílení. RING doména je také nutná při lokalizaci NSE4 a SMC5 v jaderných ohniscích při poškození DNA (Pebernard et al., 2008; Bozděchová, 2016). Mutace v RING doméně vede k přecitlivělosti na poškození DNA a úplné delecí NSE1, jež je letální nejen pro kvasinky, ale i pro huseníček (Fujioka et al., 2002; McDonald et al., 2003; Li et al., 2017; Diaz et Pecinka, 2018).

NSE3 se řadí do rodiny MAGE proteinů (MELANOMA-ASSOCIATED-ANTIGEN) (Piccoli et al., 2009; Hudson et al., 2011). U rostlin, hlístic, hmyzu a obratlovců (vyjma savců) byl nalezen pouze jeden gen MAGE (NSE3), zatímco u savců bylo potvrzeno 55 různých genů exprimujících MAGE proteiny (Piccoli et al., 2009). V lidském komplexu SMC5/6 byla prokázána přítomnost MAGEG1 proteinu, jenž je ortologem NSE3 (Taylor et al., 2008; Hudson et al., 2011). Ukázalo se, že MAGEG1 stimuluje aktivitu E3 ligázy NSE1 (Doyle et al., 2010). Funkce zbylých MAGE proteinů nejsou zcela objasněny, avšak jsou spojovány s vývojem neuronů, diferenciací buněk i apoptózou (Barker et Salehi, 2002; Kuwajima, 2006).

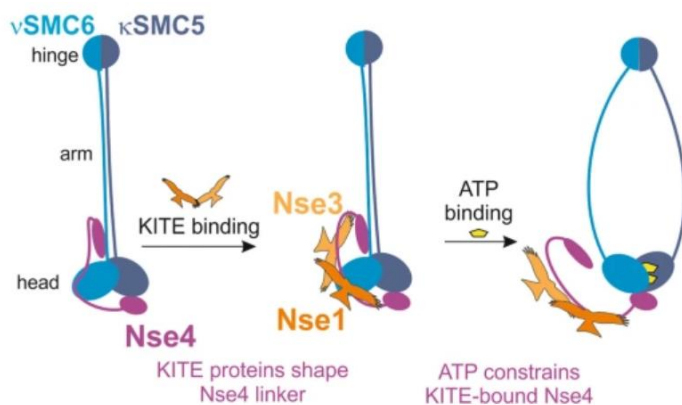
Studie na kvasinkách dokazuje, že interakce mezi SMC6 a NSE4 je zprostředkována skrze „krček“, jenž se nachází mezi ramenem a hlavovou doménou SMC6 proteinu, a skrze HTH (helix-turn-helix) terminální doménu NSE4 proteinu. Interakce mezi SMC6 a NSE4 je po navázání molekuly ATP nestabilní. Naopak stabilnější vazbou je spojena globulární hlavová oblast SMC5 proteinu s kleisinovou molekulou přes WHD (winged-helix domain) doménu (Vondrova et al., 2019). Propojení NSE1 s NSE4 či NSE3 s NSE4 umožňují winged helix B domény (WH-B). Vzájemně interagují také NSE1 a NSE3 podjednotky, a to skrze winged helix A doménu (WH-A) (Doyle et al., 2010; Paleček et Gruber, 2015; Zabrady et al., 2016).



Obrázek 8: Interakce NSE4 proteinu s jeho vazebnými partnery

NSE4 interaguje s SMC6 podjednotkou skrze HTH doménu a s SMC5 podjednotkou přes WHD doménu. S NSE4 molekulou interagují také NSE3 a NSE1 podjednotky prostřednictvím WH-B domény (Vondrova et al., 2019; Zabrady et al., 2016). Schéma vytvořeno dle předlohy Vondrova et al., 2019.

NSE1 a NSE3 (KITE) proteiny se podílí na stabilizaci SMC5-NSE4-SMC6 komplexu v nepřítomnosti ATP. Konformace s navázaným ATP je doprovázena disociací NSE4 a KITE proteinů. Při vazbě ATP dochází k rozrušení vazby mezi NSE4 a SMC6 podjednotkou a k otevření konformace komplexu. Zároveň je možná i disociace NSE3 od NSE4. Kleisin a KITE podjednotky tedy patrně pohánějí dynamiku SMC5/6 komplexu a s ním spojené molekulární mechanismy (Vondrova et al., 2019).



Obrázek 9: Schematické znázornění dynamiky SMC5/6 komplexu během ATPázového cyklu

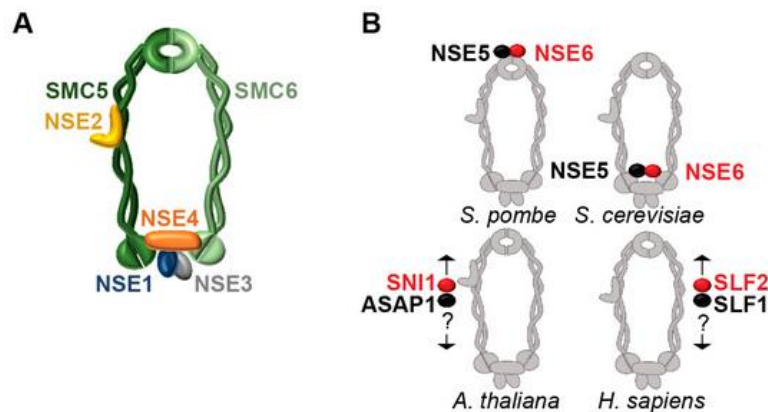
SMC5/6 podjednotky bez ATP jsou stabilizovány NSE4 proteinem, na němž jsou navázané KITE proteiny (NSE1 a NSE3). Po vazbě ATP není konformace NSE4 s asociovanými KITE proteiny kompatibilní, dochází k narušení několika protein-proteinových interakcí. NSE4 je disociována z SMC6 podjednotky, stejně tak je narušena vazba mezi NSE3 proteinem a NSE4 (Vondrova et al., 2019).

Otevřený kruhový komplex dokáže topologicky zachytit a obejmout dva řetězce DNA. Dvě vlákna DNA mohou být reprezentována dvěma sesterskými chromatidami, nebo dvěma segmenty jedné molekuly DNA. Spojení dvou segmentů jedné molekuly DNA vede k vytvoření intramolekulární smyčky. Vazba a hydrolýza ATP umožňuje motorickou aktivitu komplexu a umožňuje jeho translokaci podél molekuly DNA (Farcas et al., 2011; Kanno et al., 2015; Ganji et al., 2018; Palecek, 2018).

Součástí SMC5/6 komplexu je i NSE2 protein, známý jako MMS21 (METHYLMETHANSULFONATE SENSITIVE 21) či HPY2 (HIGH PLOIDY 2), který se váže do středové oblasti coiled coil SMC5 a je spojován se SUMO (SMALL UBIQUITIN-RELATED

MODIFIER) E3 ligázovou aktivitou (Andrews et al., 2005; Zhao et Blobel, 2005). U huseníčku je funkční aktivita NSE2 spojena s SIZ/PIAS-RING motivem. NSE2 není pro huseníček esenciální, avšak jeho nepřítomnost má vliv na výsledný fenotyp. Mutantní rostliny vykazují deformaci listů, malý vzrůst, méně semen či dokonce úplnou sterilitu (Huang et al., 2009; Ishida et al., 2009; Liu et al., 2014; Diaz et Pecinka, 2018).

Proteiny NSE5 a NSE6 tvoří heterodimer, který se pravděpodobně podílí na multimerizaci a/nebo lokalizaci celého komplexu na chromatin, a představuje jeho nekonzervovanou část. V dělicích se kvasinkách pivních (*Saccharomyces cerevisiae*) je tento heterodimer umístěn v pantových oblastech SMC5 a SMC6 proteinů a je nezbytný pro životaschopnost kvasinek (Palecek et al., 2006). Pro pučící kvasinky (*Saccharomyces pombe*) není tento heterodimer esenciální a váže se do hlavových oblastí proteinů SMC5 a SMC6. Ze studií na kvasinkách vyplývá, že NSE5/6 heterodimer může regulovat dynamiku pantů SMC5/6 komplexu. (Duan et al., 2009). U huseníčku rolního byly nalezeny dva proteiny, ASAP1 (ARABIDOPSIS SNI1 ASSOCIATED PROTEIN 1) a SNI1 (SUPPRESSOR OF NPR1-1, INDUCIBLE 1), jež interagují s SMC5 i SMC6 a mají podobnou strukturu jako NSE5 a NSE6 a mohou tedy představovat možné funkční ortology NSE5 a NSE6 (Yan et al., 2013). U člověka tvoří homology NSE5 a NSE6 proteiny SLF1 a SLF2 (SMC5/6 COMPLEX LOCALIZATION FACTOR 1, 2), které jsou zároveň součástí ubiquitinové kaskády, kde propojují SMC5/6 komplex s proteinem RAD18 majícím E3-ubikvitin ligázovou aktivitu (Raschle et al., 2015).



Obrázek 10: Architektura SMC5/6 komplexu kvasinek, rostlin a člověka

SMC5/6 komplexy kvasinek, rostlin i člověka mají podobnou architekturu (A): SMC5 a SMC6 proteiny interagují v oblasti pantu. Prostřednictvím ramen (coiled-coil) se terminální konce přibližují a vytváří aktivní místo ATPázy. Na terminální oblasti se také vážou non-SMC proteiny (NSE1, NSE3 a NSE4). NSE2 SUMO ligáza je navázána na rameno SMC5. Odlišné je pak umístění NSE5/6 heterodimeru (B): u pučících kvasinek (*S. pombe*) je umístěn v blízkosti ATPázové domény, u dělicích kvasinek (*S. cerevisiae*) je umístěn v pantové doméně. U huseníčku rolního (*A. thaliana*) byly nalezeny možné ortology těchto proteinů (ASAP1 a SNI1), stejně tak u člověka (SLF1 a SLF2), avšak jejich vazebné místo na proteinu nebylo doposud popsáno (Diaz et Pecinka, 2018).

3.3.2.2 Zapojení SMC5/6 komplexu v opravách DNA

SMC5/6 komplex je nezbytným komponentem buněčné odpovědi reagující na DSBs. Výzkum prováděný na huseníčku rolním naznačuje, že komplex SMC5/6 se účastní

postreplikativní opravy komplexních i objemných lézí převážně reparačním mechanismem HR, avšak malou roli má i při NHEJ (Diaz et Pecinka, 2018). Vazba SMC5/6 komplexu do místa poškození je patrně závislá na přítomnosti MRN komplexu (Irmisch et al., 2009; Stephan et al., 2011).

Mutanti *smc6b* a *nse2/mms21/hpy2* huseníčku rolního vykazují hypersenzitivitu vůči MMC i zebularinu, který působí nejen jako demetylační činidlo, ale je také induktorem enzymatických DPCs (Baubec et al., 2009; Liu et al., 2015; Procházková, Finke, Pečinka et al, nepublikováno). S využitím transgenních reportérových systému bylo zjištěno, že mutantní linie huseníčku *smc6a*, *smc6b* a *nse2* mají sníženou frekvenci HR (Mengiste, 1999; Watanabe et al., 2009, Yuan et al., 2014). SMC5/6 je pozitivním regulátorem HR v komplexní regulační síti, v níž kompetují jednotlivé reparační dráhy o svou účast v opravě DNA (McDonald et al., 2003; Potts et al., 2006; De Piccoli et al., 2006). Signalizace poškození indukovaných zebularinem je zprostředkována ATM a ATR kinázami, avšak mechanismus fosforylace/aktivace SMC5/6 komplexu zůstává neznámý (Garcia et al., 2003; Culligan et al., 2006; Liu et al., 2015).

Reparace založená na homologii je obtížná převážně v tandemově se opakujících částech genomu. Vysoká podobnost opakujících se jednotek zvyšuje riziko HR mezi ektopickými kopiemi, jež může vést k nechtěným přestavbám chromozomů či ztrátě genetické informace (Devos, 2002; Ampatzidou et al., 2006). Studie na kvasinkách a zvířatech naznačují, že SMC5/6 komplex se shlukuje v oblastech bariér replikačních vidlic (Replication Fork Barrier) rDNA či telomerických sekvencí během G2/M fáze a kontroluje zde HR (Torres-Rosell et al., 2005; De Piccoli et al., 2006; Piccoli et al., 2009). SMC5/6 komplex rozpoznává poškození a pravděpodobně zprostředkovává vazbu proteinu RAD52, jenž se účastní HR (Irmisch et al., 2009).

SMC5/6 komplex se podílí i na opravě zkolabované replikační vidlice (Ampatzidou et al., 2006). Při poškození DNA dochází k zastavení replikace. Pokud není replikace obnovena, může dojít ke kolapsu replikační vidlice. U kvasinek je restart replikační vidlice zajištěn SMC5/6 komplexem interagujícím s RAD52 a RPA (Betts Lindroos et al., 2006; Irmisch et al., 2009; Zapatka et al., 2019).

3.3.3 Charakterizace genu *TEBICHI*

Gen *TEBICHI* (*TEB*, AT4G32700) huseníčku rolního kóduje DNA polymerázu, která se účastní oprav dvouvláknových zlomů (DSBs) DNA mechanismem mikrohomologního spojování konců (MMEJ), avšak hraje také roli při integraci T-DNA (Kregten et al., 2016). Její úloha je rovněž spjata s regulací buněčného dělení a diferenciací meristému, stejně tak je nezbytná při replikaci a nese zodpovědnost za správnou expresi genů během vývoje (Inagaki et al., 2006, 2009).

Homologem TEB huseníčku rolního je MUS308 octomilky (*Drosophila melanogaster*), či Polymeráza théta POL θ /POLQ, jež je exprimovaná u savců, nevyjímaje člověka. U bakterií a hub se tato DNA polymeráza nevyskytuje (Inagaki et al., 2006, 2009).

Gen *TEB* v genomu huseníčku rolního se skládá z 28 exonů a kóduje polypeptid dlouhý 2 154 aminokyselin. Výsledný protein obsahuje dvě konzervované funkční domény: N-terminální DNA/RNA helikázovou doménu a C-terminální DNA polymerázovou I doménu (Inagaki et al., 2006).

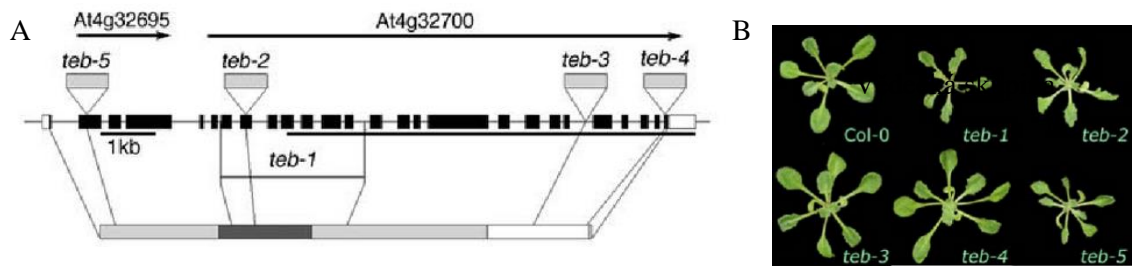
Rostliny s mutací v genu *TEB* vykazují morfologické defekty, které se projevují krátkou délkou kořínku a nadměrně zoubkovanými listy. Buněčné dělení u těchto mutantů není zcela pravidelné, stejně tak je pro ně charakteristická defektní diferenciací meristému a jsou hypersenzitivní vůči DNA crosslinkujícím činidlům. Fenotypový projev mutantních linií je silně spjatý s lokalizací dané mutace. Jestliže se mutace nachází v N-terminální helikázové doméně, vykazuje rostlina silný morfologicky defektní fenotyp popsany výše. Naopak rostlinné linie s mutací v C-terminální DNA polymerázové doméně se fenotypově spíše podobají kontrolní linii Col-0 (Inagaki et al., 2006).

3.3.3.1 Molekulární a genetická analýza genu *TEBICHI* u rostlin

Inagaki et al. (2006) skrinovali ve své sbírce mutované T-DNA linie huseníčku rolního (ekotyp Columbia-0), přičemž narazili na rostliny vyznačující se krátkou délkou kořínku. Objevená mutantní linie získala název *tebichi-1* (*teb-1*), což je v japonském dialektu výraz pro „prasečí kopýtko“. Vědecká skupina porovnávala 10denní rostliny Col-0 se stejně starými rostlinami mutantní linie. Kromě krátké délky kořínků u *teb-1* popsala i kořenové vlášení dosahující těsné blízkosti kořenové čepičky. Dalším kontrastem byly buňky kořenového apikálního meristému (RAM), jež byly u Col-0 pravidelně organizovány, naopak u *teb-1* nikoliv (Inagaki et al., 2006).

Genetická analýza *teb-1* ukázala, že fenotyp této linie je výsledkem recesivní mutace nesouvisející s inzercí T-DNA. Bylo zjištěno, že v genomické DNA *teb-1* se nachází delece o délce 2,7 kb zasahující 7. až 13. exon, což v proteinové sekvenci odpovídá helikázové doméně. Delece nenarušila expresi mutovaného genu, nýbrž vedla k produkci zkráceného transkriptu a nefunkčního proteinu (Inagaki et al., 2006).

Ve sbírce Salk Institute se nachází čtyři T-DNA mutantní linie – *teb-2*, *teb-3*, *teb-4* a *teb-5* (Alonso, 2003). T-DNA inzercí linií *teb-5* a *teb-2* narušují helikázovou doménu výsledného proteinu TEB a zároveň mají linie fenotypovou podobnost s linií *teb-1*. T-DNA inzercí linií *teb-3* a *teb-4* zasahují do polymerázové domény v proteinové sekvenci, nicméně fenotypově se tyto linie neliší od kontrolních rostlin Col-0 (viz Obrázek 11). Z těchto výsledků lze usuzovat, že vývojový fenotyp *teb* mutantů souvisí s deficitem helikázové domény proteinu TEB (Inagaki et al., 2006).



Obrázek 11: (A) Struktura genu *TEB* a lokalizace mutantních alel

Nahoře: Intron-exonová struktura genu *TEB* s mutantními alelami. Černě značeny exony, bíle značeny netranslatované oblasti. Dole: Doménová struktura proteinu *TEB*. Tmavě šedou barvou značena helikázová doména, bíle značena DNA-polymerázová doména (Inagaki, et al. 2006).

Obrázek 11: (B) Morfologické fenotypy listové růžice mutantních linií *teb*

Mutantní linie *teb-3*, *teb-4* jsou fenotypově podobné Col-0, avšak linie *teb-1*, *teb-2* a *teb-5* vykazují morfologické defektní fenotypy. Vývojový fenotyp *teb* mutantů souvisí s deficitem helikázové domény proteinu *TEB* (Inagaki, et al. 2006).

Inagaki et al. (2006) sledovali efekt crosslinkujícího činidla mitomycinu C (MMC) a alkylačního činidla metylmetan sulfonátu (MMS) na růst kořenů u mutantních rostlin. Délka kořenů *teb-1* byla v přítomnosti 0,2 mg·l⁻¹ MMC poloviční vůči délce kořenů na kontrolním médiu bez přídavku MMC, zatímco u Col-0 nebyl pozorován žádný efekt. Senzitivita *teb-1* se prokázala i u alkylačního činidla MMS. Kromě toho zkoumali dlouhodobý účinek, jenž měl dopad převážně na morfologii mutantních rostlin. Ačkoliv rostliny Col-0 pěstované na médiu obsahující vyšší koncentraci MMS byly menší, jejich morfologie nebyla ovlivněna. Naopak rostliny *teb-1* měly jasné morfologické defekty – kromě velmi malého vzrůstu měly jejich listy zoubkovaný tvar. Zajímavé je, že MMS byla rovněž ovlivněna linie *teb-3*, která se na kontrolním médiu podobala Col-0, nicméně na MMS vykazovala podobné fenotypy jako linie *teb-1*. Ve svém článku rovněž uvádí, že podobné fenotypy získali i na médiu s MMC, nicméně přesná data zde nejsou uvedena (Inagaki et al., 2006). Tyto výsledky naznačují, že vývojové fenotypy *teb* linií souvisí s odpovědí na poškození DNA (Inagaki et al., 2006).

V roce 2009 Inagaki et al. provedli sérii genetických analýz s mutantními rostlinami *teb*, jejichž výsledkem bylo zjištění, že se *TEB* podílí na replikaci a rekombinaci DNA, ale také je tato polymeráza zapojena do správné exprese genů, včetně těch regulujících vývoj organismu. Uvádí, že polymeráza *TEB* je důležitá pro udržení vzoru genové exprese po replikaci a rekombinaci DNA (Inagaki et al., 2009).

Snaha objasnit molekulární souvislost mezi odpovědí na poškození DNA a vývojovým fenotypem *teb* vedla k analýze genetické interakce *TEB* s ATM (ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED) a ATR (ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD-3 RELATED) proteinovými kinázami, které jsou klíčovými regulátory kontrolních bodů buněčného cyklu. Mezi eukaryontními organismy jsou tyto kinázy konzervované. Jsou aktivovány poškozením v molekule DNA a aktivují další buněčné komponenty pro opravu DNA či pro progresi

buněčného cyklu (Abraham, 2001). ATM hraje roli převážně v opravě dvouvláknových zlomů DNA, zatímco ATR je přítomna při opravách poškození na replikačních vidličkách v průběhu replikace, kde se nachází jednovláknové zlomy (Cimprich *et Cortez*, 2008; Liu *et al.*, 2015). Inagakiho výzkumná skupina (2009) provedla analýzu fenotypů dvojitých mutantů *teb atm*, *teb atr*. Dvojití mutanti *teb atr* měli zesílený vývojový fenotyp typizovaný morfologickými defekty, menším vzrůstem a kratšími kořeny. Naopak *teb atm* dvojití mutanti neměli na vývojový fenotyp *teb* vliv. To naznačuje funkci TEB v signální dráze ATM a roli v replikaci DNA (Inagaki *et al.*, 2009).

Kregten *et al.* (2016) zkoumali mechanismus integrace T-DNA do genomu u huseníčku rolního. Vědci demonstrovali, že procesů integrace se účastní polymeráza TEB (Kregten *et al.*, 2016). Při integraci T-DNA do uměle vytvořených dvouvláknových zlomů (DSBs) využívá *Agrobacterium tumefaciens* enzymy hostitelského organismu, které se podílejí na opravě DSBs. Původně se uvažovalo, že se do této integrace zapojují opravné dráhy využívající nehomologní spojování konců (NHEJ) (Attikum *et al.*, 2001) a HR (Tzfira, 2004). Nicméně, i při kombinovaném vyřazení obou opravných drah nadále probíhala integrace T-DNA, což vedlo k dedukci, že existuje i jiný, doposud neznámý mechanismus, který se podílí na integraci T-DNA, a tedy i opravě DNA, konkrétněji DSBs (Kregten *et al.*, 2016). Tento mechanismus je nazýván mikrohomologií zprostředkované spojování konců (microhomology-mediated end joining – MMEJ).

3.3.3.2 Mikrohomologií zprostředkované spojování konců

Oprava dvouvláknových zlomů (DSBs) je u eukaryontních organismů zajištěna dvěma mechanismy – homologní rekombinací (HR) či nehomologním spojováním konců (NHEJ) (Sargent *et al.*, 1997; Puchta, 2005). Kromě klasické opravy nehomologním spojováním konců (cNHEJ) existuje i tzv. alternativní dráha (aNHEJ), známá také jako mikrohomologií zprostředkované spojování konců (MMEJ), která na rozdíl od cNHEJ není závislá na Ligáze 4 (LIG 4) (Deriano *et Roth*, 2013). Pro průběh MMEJ je nutné, aby se na obou stranách DSBs nacházely krátké mikrohomologní sekvence o délce 5–25 bp (Decottignies, 2013).

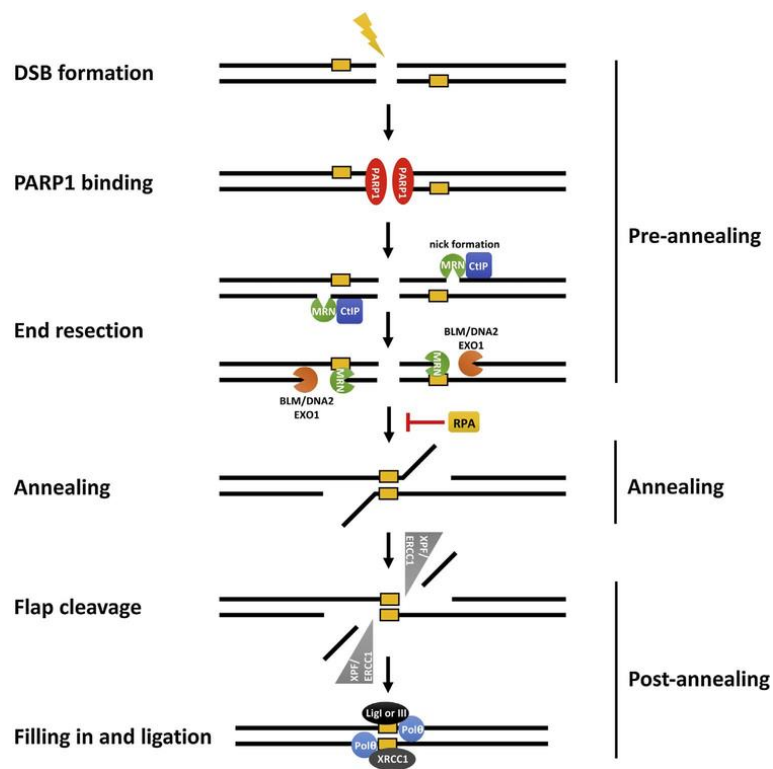
MMEJ se řadí mezi nedávno objevené reparační mechanismy. Doposud byl mechanismus MMEJ zkoumán především u kvasinek, hád'átek a savců. Ze studií vyplývá, že MMEJ nefiguruje jako záložní mechanismus, v případě že selže reparace HR či NHEJ, ale aktivně se podílí na opravě DNA, přičemž často kompetuje s HR (Truong *et al.*, 2013).

V lidských buňkách má při reparaci MMEJ důležitou roli Poly(ADP-ribose)-polymeráza 1 (PARP1), která nahrazuje funkci heterodimeru Ku. Při vzniku DSBs se PARP1 naváže na vzniklé konce a usnadní tak nábor MRN komplexu (MRE11-RAD50-NBS1) i jeho mediátoru CtIP (C-terminal interacting protein), přičemž oba tyto aktéři figurují také v rámci HR. ATPáza RAD50, jež je součástí MRN komplexu, stimuluje aktivitu MRE11 (Trujillo *et Sung*, 2001; Chen *et al.*,

2005). Svou funkcí i stavbou je RAD50 podobný SMC podjednotkám, ve své struktuře obsahuje hlavové domény s ATPázovou aktivitou a také pohyblivá ramena (Hirano, 2002). Aktivita nukleázy MRE11 je důležitá pro generování jednořetězových zářezů na DNA (McVey et Lee, 2008). MRN komplex je naváděn do blízkosti DSBs, kde degraduje DNA 3'→5' exonukleázovou aktivitou, čímž dochází k odhalení sekvenčních mikrohomiologií (MH) (Takeda et al., 2007; Nicolette et al., 2010; Truong et al., 2013; Seol et al., 2018).

Mikrohomiologní sekvence na sebe nasedají doposud neznámým způsobem. Vzniklý intermediát je modifikován XPF/ERCC1 nukleázovým komplexem, jenž odstraněním nehomologních sekvencí umožní nasednutí POLQ/POLθ zprostředkovávající syntézu vláken (Ma et al., 2003; Arana et al., 2008; Ahmad et al., 2008; Kent et al., 2015). Ligace DNA je katalyzována činností ligázy 1 a 3 (LIG 1, LIG3) (Ma et al., 2003; Liang et al., 2008; Seol et al., 2018).

Je možné, že mechanismus MMEJ se bude u různých organismů lišit, proto je nezbytné pokračovat v jeho studiích. Zároveň je otázkou, zda se mechanismus MMEJ podílí i na reparaci DPCs typu 1.



Obrázek 12: Mechanismus MMEJ v lidských buňkách

PARP1 se váže na konce DSBs a umožňuje nasednutí MRN komplexu a CtIP mediátoru. Činností MRN komplexu dochází k odhalení mikrohomiologních (MH) sekvencí (v obrázku jsou MH sekvence znázorněny žlutým obdélníkem). MH na sebe vzájemně nasedají. Pomocí nukleázového komplexu XPF/ERCC1 dochází k odstranění nehomologních sekvencí. Po navázání POLQ/POLθ dochází k dosyntetizování vláken DNA. Ligace je katalyzována LIG1 nebo LIG3 (Seol et al., 2018).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro funkční charakterizaci genů, jež se podílejí na opravách DNA-proteinových komplexů indukovanými zebularinem, byly použity rostlinné linie huseníčku rolního viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Seznam rostlinných linií

Název	Popis linie	Původ
W35	Col-0 wild type	Pecinka group
W35 mutagenizovaná M ₂ populace	Col-0 mutagenizovaná EMS	Pecinka group
<i>smc6b-1</i>	Col-0, T-DNA inserce, chromozom 5, AT5G61460	SALK_101968C
<i>teb-1</i>	Col-0, delece exonů 7–13, chromozom 4, AT4G32700	Inagaki et al, 2006
<i>mus81-1</i>	Col-0, T-DNA inserce, chromozom 4, AT4G30870	GK_113F11
<i>recE</i> (IC9)	Reportérová linie huseníčku pro studium frekvence „synthesis-dependent strand annealing“ typu HR	Barbara Hohn lab (Molinier et al., 2004)
<i>recB</i> (B11)	Reportérová linie huseníčku pro studium frekvence „single strand annealing“ typu HR	Barbara Hohn lab (Puchta et al., 1995)
<i>lig4</i>	Col-0, T-DNA inserce, chromozom 5, AT5G57160	SALK_044027
<i>fan1-1</i>	Col0, T-DNA inserce, chromozom 1, AT1G48360	GK_815C08
<i>rtell-1</i>	Col-0, T-DNA inserce, chromozom 1, AT1G79950	SALK_113285C
<i>ku70</i>	Col-0, T-DNA inserce, chromozom 1, AT1G16970	SALK_123114C

Vysterilizovaná semena byla vysévána na Petriho misky obsahující 1/2 Murashige a Skoog růstové médium, jež byly následně inkubovány 7 dní v růstové komoře s kontrolovanými podmínkami (Percival). Vyklíčené rostliny byly přesazeny do zeminy, která byla ošetřena přípravkem Careo a smíchána s perlitem v poměru 3:1. Po dobu 3–4 týdnů byly vysazené rostliny uskladněny ve fytotronu, poté byly rostliny přemístěny do skleníku. Růstové podmínky jsou shrnuty v Tabulce 2.

Tabulka 2: Růstové podmínky

Místnost	Použití	Podmínky		Účel
Percival	Petriho misky s růstovým médiem pro vyklíčení semen	Den	Noc	Klíčení semen, analýza délky kořínků 7denních rostlin
		16 hod 21 °C	8 hod 18 °C	
Fytotron	Rostliny zaseté v zemině s perlitem	16 hod 19 °C vlhkost 65 %	8 hod 18 °C vlhkost 65 %	Růst rostlin, dozrávání šesulí vzniklých hybridizačním křížením
Skleník	Rostliny zaseté v zemině s perlitem obvykle starší než 1 měsíc	16 hod 24 °C	8 hod 16 °C	Uskladnění rostlin, dozrávání jejich šesulí

4.2 Použité chemikálie, soupravy, oligonukleotidy a roztoky

4.2.1 Seznam chemikálií

- Agar (HiMedia, kat.č. RM201)
- Bleomycin (Sigma-Aldrich, kat. č. 55658-47-4)
- Camptothecin (Sigma-Aldrich, kat. č. 7689-03-4)
- DMSO (dimetyl sulfoxid) (Serva, kat.č. 39757)
- dNTPs (10 mmol·l⁻¹ each) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R0191)
- DreamTaq™ Buffer (10×) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. B65)
- DreamTaq™ Green Buffer (10×) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. B71)
- DreamTaq DNA Polymerase (5 U·μl⁻¹) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EP0705)
- *Eco130I/StyI* endonukleáza (10 U·μl⁻¹) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. ER0411)
- EDTA (kyselina ehylendiamintetraoctová) (Sigma-Aldrich, kat.č. E5134)
- Endonukleázový pufr O (10×) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. BO5)
- Etidium bromid (Top-Bio, kat. č. P047)
- Etylalkohol 96% (Lach-ner, kat. č. 20025-A96)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, kat.č. SM1333)
- Hydroxid draselný p.a. (Lach-ner, kat.č. 10003-AP3)
- Hydroxid sodný perly p.a. (Lach-ner, kat.č. 10006-AP2)
- Chlorid sodný p.a. (Lach-ner, kat. č. 30423)
- Chloroform (Lach-ner, kat. č. 20034-AT1)
- ICRF (dextrazoxan; 4,4'-(1,2-dimetyl-1,2-ethanediyl)-bis-2,6-piperazinedion) (Sigma-Aldrich, kat. č. 24584-09-6)
- Isopropylalkohol 99% p.a. (Lach-ner, kat. č. 20037-AT0)
- DNA Loading Dye (6×) (Thermo Fisher Scientific, kat.č. R0611)
- Mitomycin C (Sigma-Aldrich, kat. č. 50-07-7)
- MS směs (Duchefa Biochemie, kat.č. M0231)
- Nuclease-free water (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 10977015)
- PCR agaróza (Top-Bio, kat.č. P045)
- Phusion HF Buffer (5×) (Thermo Fisher Scientific, kat.č. F520L)
- Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (2 U·μl⁻¹) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. F530L)
- Propidium jodid (Sigma-Aldrich kat. č. P4170)

- Sacharóza p.a. (Lach-ner, kat.č. 40135-AP0)
- SDS (dodecylsírán sodný) (Lach-ner, kat. č. 40089-AP0-G1000-1)
- Tango endonukleázový pufr (10×) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. BY5)
- Tris (Sigma-Aldrich, kat.č. T1503)
- Triton X-100 (t-oktylfenoxypolyetoxyetanol) (Sigma-Aldrich, kat.č. 9002-93-1)
- Tween20 (Sigma-Aldrich, kat. č. 9005-64-5)
- T4 DNA Ligase (5 U·μl⁻¹) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EL0011)
- T4 DNA Ligase pufr (10×) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. B69)
- *Xmn*I endonukleáza (10 U·μl⁻¹) (New England Biolabs, kat. č. R0194S)
- Zebularin (1-β-D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-on) (Sigma-Aldrich, kat.č. 3690-10-6)
- β-merkaptóetanol (Sigma-Aldrich, kat. č. M3148)

4.2.2 Seznam chemických souprav

- ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 78250.40.UL)
- GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K0691)
- NucleoSpin Plant II Kit (Macherey-Nagel, BioTech, kat. č. 740770.250)
- RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, kat. č. 74904)
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K1621)
- QIAquick PCR purification (Qiagen, kat. č. 28115)

4.2.3 Seznam oligonukleotidů

Sekvence oligonukleotidů určené pro genotypizaci T-DNA linií pomocí PCR byly vygenerovány přes SIGnAL T-DNA Primer Design (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Oligonukleotidy určené pro sekvenování či CAPs marker (cleaved amplified polymorphic sequence, PCR amplifikace spojená s endonukleázovou restrikcí) byly navrženy manuálně v programu SnapGene 5.2 (GSL Biotech LLC). Syntézu oligonukleotidů zajišťovala firma Eurofins. Použité oligonukleotidy jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Seznam použitých oligonukleotidů

Název	Sekvence 5'→3'	Účel
ET0028	CGAGGATACTGGACAGTCAGGTTA	Genotypování
ET0029	CTACTAACATGTGAGGACCACCC	Genotypování
ET0032	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Genotypování

Pokračování Tabulky 3

Název	Sekvence 5'→3'	Účel
ET0035	AGCTTCAACGTGAAATCATGG	Genotypování
ET0036	CTAGACAACATGTCATACCGGG	Genotypování
ET0043	CTTCTTCAGTTGGTCCTTCATG	Genotypování
ET0044	GCTAAGGTAGTTTAGCTTCAAC	Genotypování
ET0045	ACAGGTGGGACTTCGCATATGA	Genotypování
ET0046	GAAAAGTTGAGGGATCGACACCAA	Genotypování
ET0088	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT	Genotypování
ET0222	TTTCTTGTTTGAGGTGCCCTTTTT	Genotypování
ET0223	ATTGATTCATACCCAACAGGAGCG	Genotypování
gRTEL2-F	GGGTTACCAAACGATTATAC	Genotypování
gRTEL2-R	CGACACAGAATATAAAGAACA	Genotypování
LB_API	ACTGGAACAACACTCAACCCTATCT	Genotypování
RecB F	TGCTGGTGAACACGTAAAGC	Genotypování
RecB R	CAGTCGGATGGTTCGTTTCT	Genotypování
RecE F	ACTGAGTTTGGTAACCTGTG	Genotypování
RecE R	CCAGAAGTAAAAGTGAAGTTC	Genotypování
Gus F	CGGTGATATCGTCCACCCAG	Genotypování
Gus R	TGGATCGCGAAAACCTGTGGA	Genotypování
Teb_CAPSfw	GCAGTTCATCATCACTTGCCC	CAPS marker
Teb_CAPSrs	AAACACCATCTACCTGAAGACAC	CAPS marker
Teb4E_fw	ATCGTGGTGTAAAGATCTGTTTC	PCR amplifikace a sekvenování
Teb5E_rs	AAACACCATCTACCTGAAGACAC	PCR amplifikace a sekvenování
ET0276	AAGCACCGCAGCCAAGCAGAG	PCR amplifikace a sekvenování
ET0278	AAAGAAGATTGAGAAAGACC	PCR amplifikace a sekvenování
SMC6B Produkt 1 fw	CCCTAAGCAGTCGCATCAAT	PCR amplifikace a sekvenování

Pokračování Tabulky 3

Název	Sekvence 5'→3'	Účel
SMC6B Produkt 1 rs	CCACACACGGATTTTCAACA	PCR amplifikace a sekvenování
SMC6B Produkt 2 fw	AATGTGAGTTTTGGCCGTTT	PCR amplifikace a sekvenování
SMC6B Produkt 2 rs	TTCATTGCAGTTGATTCATCC	PCR amplifikace a sekvenování
SMC6B Produkt 3 fw	TCGAGCTCAGACTGGTTGATT	PCR amplifikace a sekvenování
SMC6B Produkt 3 rs	TTACCACATGGGAGCCAATAG	PCR amplifikace, a sekvenování
SMC6B Produkt 4 fw	ACATGCTCACCAGGTTACTGC	PCR amplifikace a sekvenování
SMC6B Produkt 4 rs	TGCTTCGATCTCAGCAGCGA	PCR amplifikace a sekvenování
SMC6B Produkt 5 fw	CGCTAGTATCCATAACCGTT	PCR amplifikace a sekvenování
SMC6B Produkt 5 rs	GAGCGTTGAATCTGCTTAGAA	PCR amplifikace a sekvenování
SMC6B Produkt 6 fw	GGCAGTAAGAGTCGCTTTCC	PCR amplifikace a sekvenování
SMC6B Produkt 6 rs	ATGGACATTTCTTAATCCGAAGC	PCR amplifikace a sekvenování

4.2.4 Použité roztoky

Agarózové médium pro fotodokumentaci: Ve 100 ml destilované vody rozpustit 1 g agarózy. Roztok rozvařit v mikrovlnné troubě v uzavíratelné skleněné lahvi s neutaženým víčkem, dokud nebude zcela čirý. Po 10 ml nanášet na Petriho misky a při pokojové teplotě nechat 15 min tuhnout.

Agarózový gel pro elektroforézu: Pro přípravu 1% agarózového gelu navážit 1 g agarózy a smíchat se 100 ml TAE pufru. Roztok rozvařit v mikrovlnné troubě v uzavíratelné lahvi s neutaženým víčkem, dokud nebude zcela čirý. Do vychladlého roztoku přidat 1 μ l 5 \times ethidium bromidu. Roztok nalít do elektroforetické komůrky. Po vylití vložit do komůrky elektroforetický hřebínek.

Edwardsův pufr: Smíchat 20 ml 1 mol \cdot l⁻¹ Tris (pH 7,5 nebo 8), 5 ml 5 mol \cdot l⁻¹ NaCl, 5 ml 0,5 mol \cdot l⁻¹ EDTA a 5 ml 10% SDS. Doplnit vodou do 100 ml.

Hypochlorid sodný 8%: Smíchat 7 ml 12% NaClO s 3 ml destilované vody. S využitím automatické pipety přidat 100 μ l 20% detergentu Tween20.

1/2 Murashige a Skoog (MS) médium (pH 5,8): Smíchat 22 g MS soli (Duchefa M0231), 10 g sacharózy, 1 g MES (+ 6 g nebo 8 g agaru). Doplnit do objemu 1 l destilovanou vodou. Upravit pH na 5,8 pomocí přídatku KOH. Připravený roztok se autoklávuje.

1/2 MS médium s přídatkem 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZEB: Do 50 ml vychladlého 1/2 MS média přidat 100 μl 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku ZEB.

1/2 MS médium s přídatkem 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ICRF-187: Do 50 ml vychladlého 1/2 MS média přidat 50 μl 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku ICRF-187.

1/2 MS médium s přídatkem 20 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CPT: 3,48 mg CPT smíchat s 1 ml DMSO (10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zásobní roztok CPT). Zásobní 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok zředit znovu 1000 \times pro získání 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku. Do 50 ml vychladlého 1/2 MS média přidat 100 μl 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku CPT.

1/2 MS médium s přídatkem 50 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BLEO: Do 50 ml vychladlého 1/2 MS média přidat 25 μl 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku BLEO.

1/2 MS médium s přídatkem 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC: Do 50 ml vychladlého 1/2 MS média přidat 222 μl 2,25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku MMC.

50x TAE pufr: Rozpustit 242 g Tris v 800 ml destilované vodě, přidat 57,1 ml 99% kyseliny octové a 100 ml 0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA (pH 8). Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml.

0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA (pH 8): 186,1 g EDTA rozpustit v 800 ml destilované vody, upravit pH přídatkem NaOH na požadovanou hodnotu. Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml a sterilizovat filtrací.

1x TAE pufr: Smíchat 20 ml 50x TAE pufru a doplnit destilovanou vodou do 1000 ml.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Automatická třepačka (Heidolph Reax)
- Centrifuga MiniStar Silverline (VWR)
- Centrifuga myFuge Mini (Benchmark Scientific)
- Centrifugační evaporátor (SPD1010)
- Chlazená mikrocentrifuga Fresco 17 (Thermo Fisher Scientific)
- Digitální předvážky Scout SC4010 (Ohaus)
- Elektroforetická komora (Bio-Tech)
- Flow box (Biohazard Thermo Scientific)
- Fotoaparát Nikon, AF-S Micro (Nikon)
- Fytotromová komora (Wiss Gallenkamp)
- Konfokální mikroskop Leica TCS SP8 (Leica Microsystems)
- Laboratorní digestoř M 1800 (Merci 1800)
- Laminární box MSC 1.2 Advantage (Thermo Fisher Scientific)
- Magnetická míchačka VS-C7 (VWR)
- Mikrovlnná trouba EMN (Zanussi 2015)
- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, program ND-1000 V3.8.1 (Thermo Fisher Scientific)
- pH metr InoLab pH 7110 (WTW)
- Predikce sekundární struktury proteinů – online aplikace PSIPRED
- Souprava pro horizontální gelovou elektroforézu (Bio-Rad)
- Termostatovaná třepačka MaxQ 4000 (Thermo Fisher Scientific)
- Thermocycler T-Gradient (Biometra)
- Transiluminátor InGenius LHR (Syngene), program GeneSnap (Syngene)
- Tvorba schémat – online aplikace BioRender
- Zpracování a analýza snímků – program Image J (Java) a Adobe Photoshop CS5 (Adobe)
- Zpracování struktury genů, navrhování sekvencí primerů – Snapgene (verze 5.2)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Sterilizace semen

Sterilizace semen se prováděla 24–48 hod před samotným vyséváním na Petriho misky s růstovým médiem za účelem zabránění kontaminace sterilního růstového média během klíčení. Vysušená semena umístěná v 1,5ml zkumavce byla promývána v 70% EtOH po dobu 5 min. Po vyjmutí EtOH byla semena sterilizována v 8% roztoku hypochloridu sodného s přidavkem 1% Tweenu20 v čase 9–12 min. Hypochlorid byl odstraněn vymýváním sterilní vodou. K vymytým semenům byla následně přidána 0,1% agaróza, díky jejíž konzistenci semena při vysévání na médium neztékala. Vysterilizovaná semena se poté stratifikovala v lednici při 4 °C, což umožnilo synchronizaci klíčení.

4.4.2 Testování senzitivity na chemikáliích

Kandidátní rostlinné linie s potvrzenou mutací byly vysévány na Petriho misky s růstovým médiem obsahujícím vybrané chemikálie poškozující DNA (Pecinka and Liu, 2014). Jednalo se o 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZEB, 20 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CPT, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ICRF-187, 50 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BLEO a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC. Kontrolní misky neobsahovaly žádnou z těchto chemikálií. Cílem experimentu bylo zjistit, zda testované linie budou senzitivní vůči těmto chemikáliím – zda jejich genová mutace ovlivňuje reparaci poškození, které tyto chemikálie způsobují.

Petriho misky s vysetými semeny byly inkubovány 7 dní v percivalu. Po týdnu byly rostliny z jednotlivých Petriho misek s chemikáliemi nataženy na 1% agar a fotografovány. Pomocí programu Image J a interní kontroly byly pro každou rostlinnou linii stanoveny přesné délky kořínků z jednotlivých Petriho misek. Naměřené délky kořínků sloužily pro výpočet průměrných délek kořínku.

Pro každou rostlinnou linii byl důležitým parametrem poměr průměrných délek kořínku na médiu s chemikálií a na kontrolním 1/2 MS médiu. Tento poměr sloužil ke vzájemnému porovnání rostlinných linií a hodnocení senzitivity. Pro každou linii byly zhotoveny tři replikáty, kdy jeden replikát tvořilo přibližně 30 rostlin. Z výsledných poměrů byla poté vypočítána směrodatná odchylka.

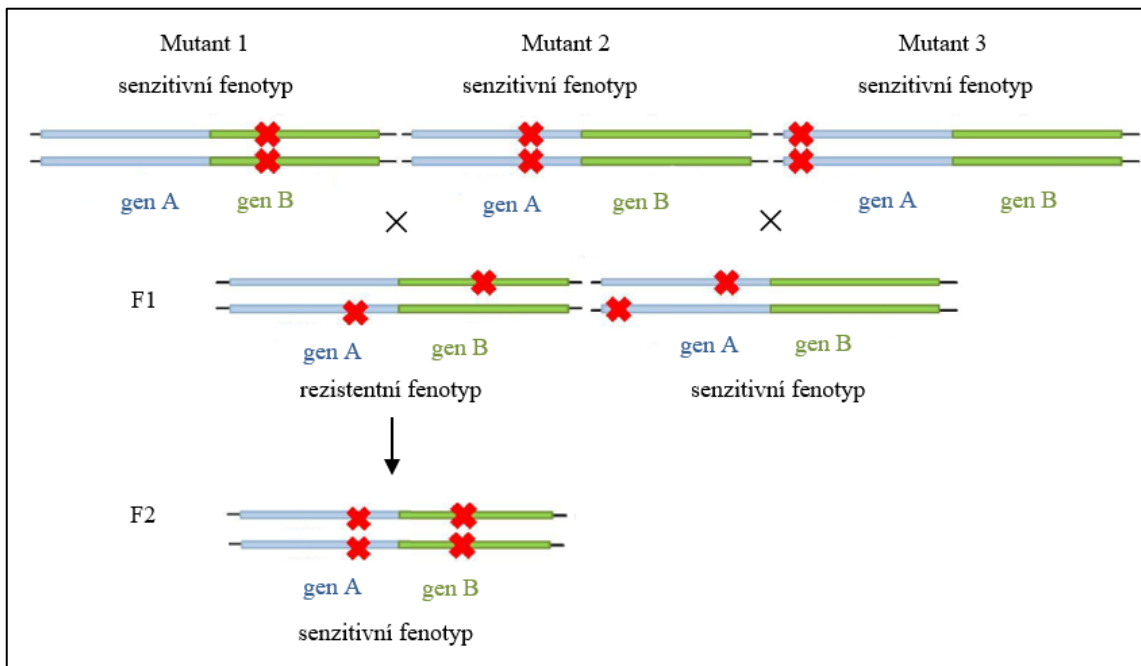
Výsledné hodnoty poměrů sloužily pro jednofaktorovou analýzu rozptylu ANOVA (Analysis of Variance) v programu Minitab. Po zamítnutí nulové hypotézy rovnosti středních hodnot byl následně použit Tukeyův-HSD test („honestly“ significant difference test) umožňující mnohonásobné porovnávání. Za statisticky signifikantní byly brány výsledky s $P \leq 0,05$.

4.4.3 Hybridizační a komplementační křížení

Princip komplementačního testování či testu na alelismus spočívá v křížení mutantní linie se známou recesivní mutací s linií mající podobný fenotyp, u níž se domníváme, že mutace postihuje stejný gen. Při křížení dvou recesivních mutantů vykazuje F_1 potomstvo stejné

rodičovské znaky – opět jsou recesivními mutanty. Pokud by křížené linie nesly mutace v odlišných genech, fenotyp F₁ linie by se podobal standardnímu fenotypu daného organismu, jelikož recesivní mutace by vymizela a F₁ potomci by byli heterozygotní.

Hybridizační křížení spočívá ve vnášení alel a jejich znaků do populace. Dochází k hybridizaci linie nesoucí recesivní mutaci v genu A s linií nesoucí recesivní mutaci v genu B. F₁ hybridi budou dle Mendlového zákona heterozygoti (1. Mendelův zákon o stejnorodosti populace). V F₂ generaci se budou vyštěpovat znaky rodičů v charakteristickém poměru celých čísel 9:3:3:1. Častěji nás poté zajímají právě jedinci nesoucí recesivní mutace v obou genech (mutace v genech A i B), jejichž četnost je v populaci nejmenší.



Obrázek 13: Princip komplementačního a hybridizačního křížení

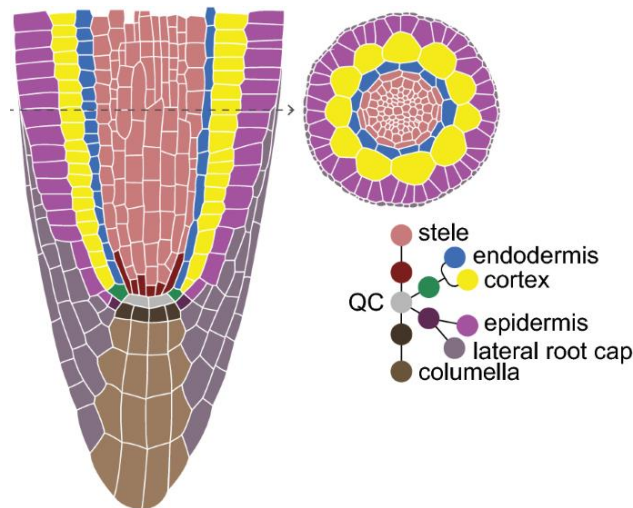
Při křížení dvou mutantních linií nesoucích recesivní mutace ve stejném genu (mutant 2 × mutant 3) vzniká F₁ potomstvo vykazující stejný senzitivní fenotyp jako parentální generace. Pokud se naopak kříží dvě mutantní linie nesoucí recesivní mutace v odlišných genech (mutant 1 s mutací v genu B × mutant 2 nesoucí mutaci v genu A), vzniká F₁ potomstvo vykazující rezistentní fenotyp – recesivní mutace byly potlačeny a v sledovaných genech jsou tyto potomci heterozygotní. Avšak v následující F₂ generaci může dojít k opětovnému výskytu mutací, buď v genu A nebo B, či v obou genech zároveň (upraveno Kruska, 2017)

Huseníček rolní se řadí mezi samosprašné rostliny. Pro křížení byly vybírány pupeny s nezralými prašníky, které měly zelenou barvu. Při křížení musely být z pupenů prašníky odstraněny, aby se zabránilo přenosu vlastního pylu na bliznu. Emaskulované květy se po jednom až dvou dnech opylovaly pylovými zrny jiné linie huseníčku rolního. Po 3 týdnech růstu ve fytotromu byly zralé šesule s hybridními semeny sesbírány tak, aby nedošlo ke kontaminaci jinými šesulemi s nehybridními semeny vzniklými klasickým samosprašením.

4.4.4 Analýza buněčné smrti v kořenovém meristému

Kořen je symetrický radiální rostlinný orgán, který se skládá z různých buněk. Vně lemují kořen buňky epidermis, následují buňky kortexu, endodermis a vaskulární tkáň. Podélně lze kořen rozdělit do tří zón – kořenový apikální meristém (RAM), elongační zónu (EZ) a maturační zónu (MZ).

Ve špičce kořene v RAM je lokalizována skupina buněk s nízkou mitotickou aktivitou nazývaná jako klidové centrum (quiescent center, QC). Buňky QC jsou dále obklopeny 4 typy kmenových buněk pro (1) epidermis/laterální buňky kořenové čepičky; (2) kortex/endodermis; (3) vaskulární tkáň a (4) kořenovou čepičku (columella). Pro tyto buňky je charakteristické, že se dělí asymetricky, čímž vznikají jednotlivé dceřinné buňky s definovanou funkcí (Dolan et al., 1993).



Obrázek 14: Architektura kořenového meristému

V kořenovém meristému se nachází skupina buněk s nízkou mitotickou aktivitou (quiescent center QC) – označeny světle šedou barvou. QC obklopují 4 typy kmenových buněk pro epidermis/laterální buňky kořenové čepičky (tmavě fialová); kortex /endodermis (zelená); vaskulární tkáň (tmavě červená) a kořenovou čepičku (černá). Tyto buňky se dělí asymetricky, čímž vznikají již definované dceřinné buňky epidermis (světle fialová), laterální kořenové buňky (tmavě šedá), buňky endodermis (modrá) a kortexu (žlutá), vaskulární buňky (světle červená) a buňky kořenové čepičky (hnědá) (Rahni et Birnbaum, 2019).

Meristemická zóna obsahuje buňky s nejvyšší proliferační aktivitou a představuje přechodnou zónu, v níž se buňky začínají prodlužovat (Ivanov et Dubrovsky, 2013). Rostlinné kmenové buňky tvoří prekurzory všech tkání pro celý rostlinný organismus, z toho důvodu je zde zároveň důležitá ochrana před poškozením DNA. Buňky kořene a apikálního meristému jsou vysoce citlivé vůči genotoxickému stresu. I při nízké úrovni poškození DNA dochází v meristemické tkáni k selektivnímu výskytu programované buněčné smrti (Fulcher et Sablowski, 2009).

Propidium jodid je fluorescenční interkalační barvivo, které je vůči buněčným membránám intaktní. Pokud je některá buňka v kořenovém meristému poškozena, proniká propidium jodid do jejího nitra, díky čemuž je v konfokálním mikroskopu umožněna její vizualizace. Propidium jodid

je vhodný pro analýzu buněčné smrti a kvantifikaci poškození DNA spojeného s replikací v mutantních liniích. V závislosti na povaze defektu při zpracování aberantní replikace je za normálních podmínek růstu rostlin detekovatelná zvýšená buněčná smrt (Röhrig et al., 2016; Klemm et al., 2017).

Vysterilizovaná semena byla vyseta na tuhé 0,8% 1/2 MS médium. Petriho misky se semeny byly inkubovány v percivalu ve vertikální poloze. 5denní semenáčky byly přeneseny z 0,8% 1/2 MS média do tekutého 1/2 MS média bez přídavku chemikálie a s 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZEB. Linie s mutací v genu *TEBICHI* byly dále přeneseny také do 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ICRF-187, 50 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BLEO a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC. Následovala 12–24 hod inkubace. Pro vizualizaci poškozených a mrtvých buněk v kořenovém meristému u 6denních semenáčků byl využit konfokální mikroskop Leica TCS SP8 (Leica Microsystems).

Na podložní sklíčko bylo nanášeno 150 μl 100 \times propidium jodidu. 6denní semenáčky byly po přenesení na podložní sklíčko přikryty krycím sklíčkem. Následovala analýza na konfokálním mikroskopu s 20 \times zvětšením.

4.4.5 Izolace DNA

Pro většinu molekulárně genetických analýz je nezbytným krokem izolace DNA. V rámci diplomové práce byly využity dva postupy – izolace dle upraveného protokolu Edwardse (Edwards et al., 1991) a izolace na kolonkách s využitím soupravy NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, BioTech).

4.4.5.1 Upravený protokol Edwardse

Upravený protokol Edwardse sloužil k izolaci DNA, jež byla využívána pro genotypizaci pomocí PCR amplifikace. Výhodou metody je malé vstupní množství rostlinného materiálu a finanční nenáročnost. Protokol je vhodný i pro multikapacitní izolaci DNA, početní omezení klade pouze 96jamková destička. Vyizolovaná DNA však nedosahuje příliš velké čistoty a rychleji podléhá degradaci, avšak pro genotypizaci PCR amplifikací je takto vyizolovaná DNA dostačující.

Malé kousky listu z jednotlivých rostlin (0,5–1 \times 0,5 cm) se vložily do 1,5ml VWR mikrozkušavek, které byly naplněny skleněnými kuličkami o průměru 1,26–1,65 mm. Po odebrání jednotlivých vzorků byly mikrozkušavky uzavřeny a zmrazeny v tekutém dusíku. Následovala homogenizace v Tissue Raptoru, kdy bylo třeba dávat pozor, aby zkušavky nerozmrzly a zároveň aby se rostlinný obsah zhomogenizoval. Homogenizace se proto většinou prováděla ve dvou opakováních.

Po homogenizaci bylo ke vzorkům přidáno 100 μl Edwardsova pufru. Zkušavky byly centrifugovány při 2250 g po dobu 20 min. Z každého vzorku byl přenesen supernatant o objemu 80 μl na 96jamkovou destičku. Po přidání 80 μl izopropanolu se destičky zcentrifugovaly při 2250 g po dobu 10 min. Supernatant byl slit a po přidání 70% EtOH byly destičky opět

zcentrifugovány za stejných podmínek. Supernatant byl vyjmut. Aby došlo k odpaření zbývajícího EtOH, nechaly se destičky sušit na buničině dnem vzhůru při pokojové teplotě po dobu 1 hod. Pelet byl následně rozpuštěn v 50 μl TE pufru.

4.4.5.2 Kolonková izolace NucleoSpin Plant II

Kolonková izolace představuje rychlou metodu pro získání DNA o vyšší kvalitě. Vyizolovaná DNA je vhodná pro PCR amplifikaci a následnou sekvenaci či endonukleázové štěpení.

Pro izolaci se využívaly rostliny staré 7 dní o navážce 100 mg. Rostliny se vložily do 1,5ml zkumavky se skleněnými kuličkami o průměru 1,26–2 mm. Po zamrazení v tekutém dusíku následovala stejně jako v předešlé izolaci homogenizace s využitím Tissue Raptoru. Ke zhomogenizovanému prášku bylo přidáno 300 μl pufru PL2 a 10 μl RNázy A. Další kroky probíhaly standardním postupem dle instrukcí výrobce.

4.4.6 Izolace RNA a syntéza cDNA

RNA byla izolována pomocí kolonkové soupravy RNeasy Plant Mini firmy Qiagen standardním postupem. Pro izolaci RNA se opět využívaly rostliny staré 7 dní o navážce 100 mg. Před homogenizací rostlin se připravily roztoky nutné pro izolaci o potřebném objemu (na 3 vzorky):

- 1) 1 ml pufru RLT se smíchal s 10 μl β -merkaptoetanolu
- 2) 5 μl DNázy I se smíchalo s 25 μl $10\times$ RDD pufru a 220 μl ddH₂O.

Následné kroky izolace probíhaly dle instrukcí výrobce. Po stanovení koncentrace bylo možné RNA uskladnit v mrazícím boxu o teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, případně pokračovat v syntéze cDNA.

Při syntéze cDNA byl k 1–2 μg RNA přidán 1 μl Oligo(dT) primerů ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), reakce byla doplněna vodou, jež byla zbavená nukleáz, do objemu 12 μl . Následovala inkubace 5 min při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ v termocycleru. Do reakce byly po inkubaci přidány chemikálie dle Tabulky 2:

Tabulka 4: Syntéza cDNA

Látka	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem [μl]
Reakční pufr	$5\times$	$2,5\times$	4
Ribolock RNázový inhibitor	$20\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	$2,5\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1
dNTPs	$10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	$2,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	2
RevertAid reverzní transkriptáza	$200\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	$25\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1

Syntéza cDNA probíhala 1 hod při $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně 5 min při $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nasyntetizovaná cDNA byla použita pro PCR amplifikaci, případně byla uskladněna do lednice se stabilní teplotou $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.7 Polymerázové řetězové reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) slouží k amplifikaci specifických úseků DNA. Samotná reakce probíhá v přístroji zvaném thermocycler, jenž zajišťuje měnící se teplotní a časové podmínky jednotlivých fází a také opakování cyklů. V první fázi PCR dochází k denaturaci dsDNA na ssDNA. Na jednovláknové molekuly DNA následně nasedají specifické primery, od nichž polymeráza syntetizuje komplementární vlákno. Opakováním těchto cyklů dochází k exponenciálnímu nárůstu kopií specifického úseku DNA.

V rámci výzkumu byly použity dva principy PCR – klasická či konvenční PCR a inverzní PCR. Konvenční PCR slouží k amplifikaci úseku ohraničeného dvěma primery směřujícími dovnitř. Konvenční PCR se využívala pro naamplifikování konkrétního úseku za účelem sekvenace či genotypizace (viz kapitola 4.4.8). Naopak inverzní PCR se využívá na amplifikaci neznámého úseku. Při této PCR je nutné DNA naštěpit restrikcí enzymem, přičemž k jedné ze dvou restrikcí dojde v neznámé sekvenci. Nafragmentované úseky se následně ligují do cirkulární molekuly, která slouží jako templát pro PCR amplifikaci (Clark et al., 2019).

4.4.7.1 Konvenční polymerázová řetězová reakce

Konvenční PCR reakce slouží k amplifikaci úseku, jež je ohraničen dvěma primery směřujícími dovnitř. Pro PCR amplifikaci specifického úseku DNA za účelem zjištění jeho nukleotidové sekvence byla použita Phusion polymeráza s proofreading aktivitou (Thermo Fisher Scientific). Teplota umožňující hybridizaci primerů byla specifická pro každý primerový pár a byla odvozována z teplot tání jednotlivých primerů. Při využití více primerových párů se využívala průměrná teplota pro nasedání primerů. Objemy jednotlivých reagentů tvořící PCR premix jsou uvedeny v Tabulce 5. Teplotní a časové podmínky jednotlivých fází jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 5: Složení PCR reakční směsi

Látka	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem [μl] (objem reakce 25 μl)
Phusion HF pufr	5 \times	1 \times	5
DNA, cDNA	$\sim 50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	$\sim 1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0,5
Primer forward	$10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,5
Primer reverse	$10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,5
Polymeráza Phusion	$2 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	$0,02 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	0,25
dNTPs	$10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,5
ddH ₂ O	-	-	17,75

Tabulka 6: Podmínky PCR

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	
Nasedání primerů	průměrná teplota tání primerů snižená o 5 °C	20 s	35
Elongace	72	30 s/kb	
Závěrečná elongace	72	10 min	1
Dokončení reakce	4	∞	

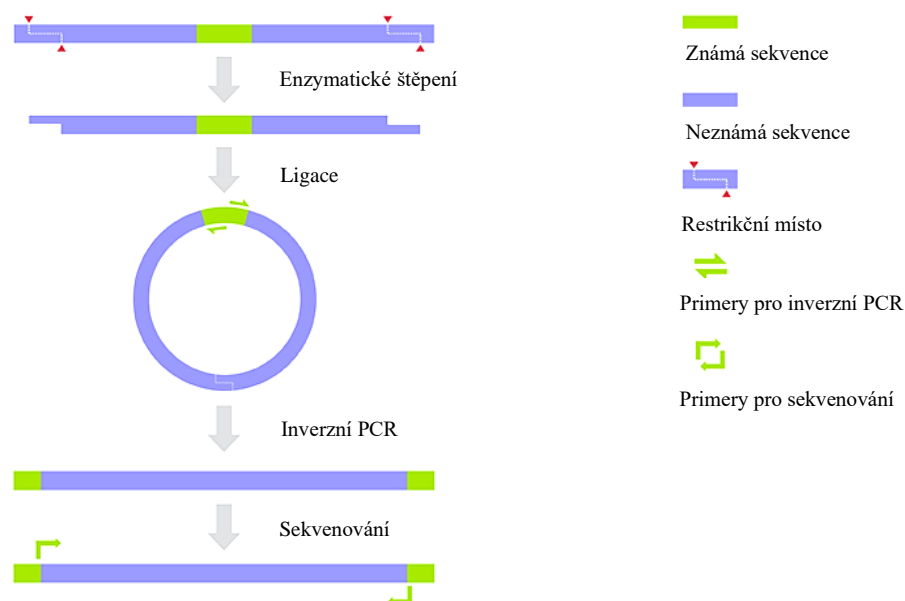
Úspěšnost PCR byla hodnocena elektroforézou na 1–2% agarózovém gelu s přidavkem ethidium bromidu. Pro stanovení velikosti PCR produktů byl použit marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Vizualizace probíhala pomocí UV transiluminátoru.

Úspěšně naamplifikované PCR produkty byly purifikovány metodou ExoSAP (Thermo Fisher Scientific). Pokud se v gelu nacházely i jiné nespecifické produkty odchylovající se od očekávané velikosti, byl veškerý PCR produkt znovu separován pomocí gelové elektroforézy, přičemž specifické produkty byly z gelu vyřezány a purifikovány pomocí soupravy GeneJET Extraction. Extrakce z gelu však nebyla šetrná a vedla k určité ztrátě naamplifikovaných kopií. Proto bylo nutné přečištěné DNA produkty reamplifikovat.

PCR produkty byly sekvenovány Sangerovou metodou firmou SEQMe. Příprava PCR produktů spočívala v zakoncentrování vakuovým evaporátorem na koncentraci $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Jedna sekvenační reakce se skládala z 5 μl zakoncentrovaného PCR produktu a 5 μl $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ primeru.

4.4.7.2 Inverzní polymerázová řetězová reakce

Inverzní PCR slouží k amplifikaci neznámé nukleotidové sekvence, vedle níž se nachází známá sekvence se specifickými primery. Důležitým krokem inverzní PCR bylo štěpení DNA restriční enzymem v neznámé sekvenci. DNA fragmenty se následně pomocí ligace spojily do kruhové molekuly, která byla dále použita jako templát při inverzní PCR. Neznámá sekvence byla amplifikována dvěma primery nasedajícími na známou sekvenci.



Obrázek 15: Princip inverzní PCR

DNA je naštěpena restriční enzymem v neznámé sekvenci. Fragmentované úseky DNA jsou ligovány do kruhové molekuly, která slouží jako templát pro inverzní PCR (Clark et al., 2019).

Rostlinná DNA byla izolovaná pomocí kolonkové soupravy NucleoSpin plant II (Macherey-Nagel, BioTech). Pro endonukleázové štěpení enzymem *XmnI* ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) (New England Biolabs) a *Eco130I* ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) (Thermo Fisher Scientific) bylo třeba 0,5–2 μg DNA. Objemy použitých reagensů pro oba enzymy byly ponechány dle instrukcí výrobce viz Tabulka 7 a Tabulka 8. Digesce běžela přes noc při 37 °C. Po inaktivaci restričního enzymu (vystavení teplotě 65 °C po dobu 20 min) byly DNA fragmenty přečištěny pomocí kolonkové soupravy QIAquick PCR purification. Na konečnou eluci bylo použito 50 μl TE pufru.

Tabulka 7: Digesce gDNA enzymem *XmnI* (NEB)

Látka	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem [μl]
NEB pufr	10×	1×	5
Enzym <i>XmnI</i>	$10 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	$0,2 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	1
DNA	$0,5\text{--}2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	$10\text{--}40 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	1
ddH ₂ O (nuclease-free)	-	-	Doplnit do 50 μl

Tabulka 8: Digesce gDNA enzymem *Eco130I* (Thermo Fisher Scientific)

Látka	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem [μl]
Pufr O	10×	1×	2
Enzym <i>Eco130I</i>	10 U·μl ⁻¹	0,5 U·μl ⁻¹	1
PCR produkt	0,5–2 μg·μl ⁻¹	25–100 ng·μl ⁻¹	1
ddH ₂ O (nuclease-free)	-	-	16

Pro ligaci bylo třeba 10–50 ng DNA. Ligační reakce se skládala z rozfragmentované DNA, T4 DNA ligázy, T4 DNA ligázového pufru a ddH₂O (Thermo Fisher Scientific). Jednotlivé objemy reagensů jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9: Složení ligační směsi

Látka	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem / pipetované množství
T4 DNA ligáza	5 U·μl ⁻¹	0,1 U·μl ⁻¹	1 μl
Ligázový pufr	10×	1×	5 μl
Lineární DNA	-	-	10–50 ng
ddH ₂ O	-	-	Doplnit do 50 μl

Při ligaci lepivých konců byla nutná inkubace 1 hod při pokojové teplotě. Následovala PCR amplifikace – gDNA, jež byla štěpena enzymem *XmnI*, byla po ligaci amplifikována dvojicí primerů SMC6B Produkt 3rs a ET276, gDNA štěpená enzymem *Eco130I* byla po ligaci amplifikována primery JJ010 a ET276. Objemy reagensů pro inverzní PCR jsou uvedeny v Tabulce 10. Podmínky inverzní PCR jsou uvedeny v Tabulce 11.

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro inverzní PCR

Látka	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem [μl] (objem reakce 50 μl)
Dream Taq pufr	10×	1×	5
Primer forward	10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	2,5
Primer reverse	10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	2,5
dNTPs	2 mmol·l ⁻¹	0,2 mmol·l ⁻¹	5
Polymeráza Dream Taq	5 U·μl ⁻¹	0,025 U·μl ⁻¹	0,25
ddH ₂ O	-	-	32,75
ligovaná DNA	-	-	2

Tabulka 11: Podmínky inverzní PCR

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	3 min	1
Denaturace	95	30 s	
Nasedání primerů	průměrná teplota tání primerů snižená o 5 °C	30 s	35
Elongace	72	1 min/kb	
Závěrečná elongace	72	10 min	1
Dokončení reakce	4	∞	

Po PCR amplifikaci následovala gelová elektroforéza (1,5% agarózový gel) s extrakcí z gelu. Bandy PCR produktů, jež byly předmětem zájmu, byly vyřezány z gelu a purifikovány pomocí kolonkové soupravy GeneJET. Podle nutnosti byly tyto produkty opět reamplifikovány. Purifikované a zakocentrovány PCR produkty byly sekvenovány Sangerovým sekvenováním firmou SEQMe.

4.4.8 Genotypizace

Genotypizace slouží k určení alelické konstituce genu. Odlišení jednotlivých alel je umožněno díky přítomnosti markerů, které jsou reprezentovány jednonukleotidovými polymorfismy (SNP), opakujícími se repeticemi či tzv. indely (inzerce, delece). V diplomové práci pro detekci SNP byl využit CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) marker. Pro detekci T-DNA inzerce byla využita PCR amplifikace se specifickým oligonukleotidem pro inzert. Výhoda obou metod spočívá v jejich kodominantním charakteru, dokážou rozlišit jak homozygotní, tak heterozygotní konstituci daného genu.

4.4.8.1 Genotypizace T-DNA linií, reportérových linií a linie *teb-1* pomocí metody PCR

T-DNA linie vznikly náhodnou mutagenézou zprostředkovanou *Agrobacterium tumefaciens* prostřednictvím jejich Ti-plazmidu. T-DNA se začleňuje do rostlinného genomu, čímž vytváří mutace. Inzertované sekvence zároveň slouží jako markery, které je možné detekovat.

Reportérové linie *recB* (B11) a *recE* (IC9) slouží pro hodnocení frekvence homologní rekombinace. Linie *recB* obsahuje přímé repetice pro rekombinační substrát a slouží pro detekci frekvence HR typu „single strand annealing“ (Puchta et al., 1995). Linie *recE* (IC9) obsahuje obrácené repetice a slouží pro detekci frekvence HR typu „synthesis-dependent strand annealing“ (Molinier et al, 2004).

Z testovaných T-DNA linií, reportérových linií a mutantní linie *teb-1* se nejprve izolovala DNA dle upraveného protokolu Edwardse (kapitola 4.1.1.1).

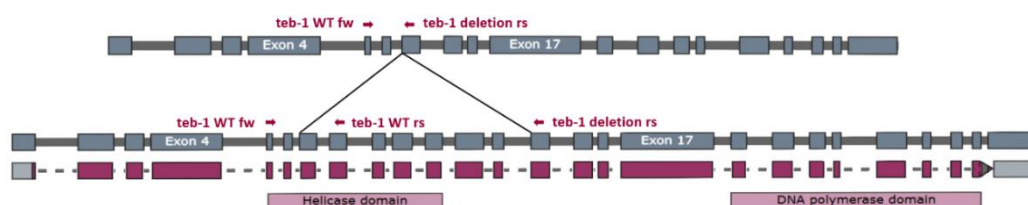
Po izolaci DNA následovala PCR amplifikace. Přítomnost reportérových alel byla hodnocena PCR amplifikací sekvence pro β -glukuronidasu (GUS). Pro genotypizaci T-DNA linií byly připraveny vždy dvě sady PCR premixů. Jeden premix obsahoval oligonukleotidy specifické

pro WT alelu (bez T-DNA inserce), druhý zaměřoval jeden z WT oligonukleotidů za specifický oligonukleotid pro amplifikaci T-DNA inzertu (viz Tabulka 12).

Tabulka 12: Genotypizace T-DNA a reportérových linií

Gen	Alela	WT alela		T-DNA inzert	
		Forward	Reverse	Forward	Reverse
<i>SMC6B</i> At5g61460	<i>smc6b-1</i> , SALK_101968C	ET0035	ET0036	ET0035	LB_AP1
<i>RTEL1</i> At1g79950	<i>rte1-1</i> , SALK_113285C	gRTEL2-F	gRTEL2-R	gRTEL2-F	LB_AP1
<i>KU70</i> At1g16970	<i>ku70</i> , SALK_123114C	ET0043	ET0044	ET0043	LB_AP1
<i>LIG4</i> AT5G57160	<i>lig4</i> , SALK_044027	ET0045	ET0046	ET0045	LB_AP1
<i>FAN1</i> AT1G48360	<i>fan1</i> , GK_815C08	ET0028	ET0029	ET0028	ET0032
<i>MUS81</i> AT4G30870	<i>mus81-1</i> , GK_113F11	ET0222	ET0223	ET0223	ET0088
<i>REC E</i> (IC9)	<i>rec E</i> Molinier et al., 2004	RecE F	RecE R	Gus F	Gus R
<i>REC B</i> (B11)	<i>rec B</i> Puchta et al., 1995	RecB F	RecB R	Gus F	Gus R

V případě genotypizace linie *teb-1* (Inagaki et al., 2006) nesoucí 2,7 kb delecii v gDNA zasahující 7.–13. exonu genu *TEBICHI* (*TEB*) byly oligonukleotidy navrženy manuálně v programu SnapGene (Obrázek 16). Pro analýzu WT alely byl specifický reverzní oligonukleotid (*teb-1* WT rs) lokalizován do exonu 8, jenž spadá do deletované oblasti mutantní alely *teb-1*. Pro genotypizaci mutantní alely byl reverzní oligonukleotid (*teb-1* deletion rs) navržen do exonu 14. Oba primery byly kombinovány s forward oligonukleotidem pojmenovaným *teb-1* WT.



Obrázek 16: Genotypizace linie *teb-1*

Nahoře: Intron-exonová struktura genu *TEBICHI* mutantní linie *teb-1* obsahující 2,7 kb delecii zasahující 7.–13. exon. **Dole:** Šedě znázorněna intron-exonová struktura genu *TEB* bez delecce. Purpurově značena proteinová struktura TEB s helicázovou a DNA polymerázovou doménou. Šipkou značeny použité oligonukleotidy umožňující genotypizaci mutantní linie *teb-1*.

Kombinace oligonukleotidů sloužící pro genotypizaci mutantní linie *teb-1* jsou pro přehlednost uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13: Genotypizace linie *teb-1*

Gen	Mutantní alela	WT alela		Delece	
		Forward	Reverse	Forward	Reverse
TEB AT4G32700	<i>teb-1</i> Inagaki et al, 2006	<i>teb-1</i> WT fw	<i>teb-1</i> WT rs	<i>teb-1</i> WT fw	<i>teb-1</i> deletion rs

Pro PCR amplifikaci byla použita DreamTaq polymeráza s 10× DreamTaq pufrém (DreamTaq™ Buffer, DreamTaq™ Green Buffer, Thermo Fisher Scientific). Jednotlivé reagensie PCR reakce jsou shrnuty v Tabulce 14. Podmínky PCR jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 14: Složení PCR reakční směsi pro genotypizaci T-DNA linií a linie *teb-1*

Látka	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem [μl] (celkový objem 20 μl)
Dream Taq reakční pufr	10×	1×	2
Primer forward	10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	1
Primer reverse	10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	1
dNTPs	2 μmol·l ⁻¹	0,2 μmol·l ⁻¹	2
Polymeráza Dream Taq	5 U·μl ⁻¹	0,025 U·μl ⁻¹	0,1
DNA	-	-	1
ddH ₂ O	-	-	12,9

Tabulka 15: Podmínky PCR pro genotypizaci T-DNA linií a linie *teb-1*

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	3 min	1
Denaturace	95	30 s	
Nasedání primerů	průměrná teplota tání primerů snižena o 5 °C	30 s	35
Elongace	72	1 min/kb	
Závěrečná elongace	72	10 min	1
Dokončení reakce	4	∞	

Po PCR amplifikaci následovala gelová elektroforéza v 1% agarózovém gelu s ethidium bromidem. Dle přítomnosti naamplifikovaných bandů bylo možné určit genotyp analyzovaných rostlinných linií.

4.4.8.2 Genotypizace DPCR kandidáta 9B-43 pomocí CAPS markeru

Nalezená DPCR kandidátní linie 9B-43 nese v genu *TEB* SNP mutaci, která zapříčiňuje zánik restrikčního místa pro enzym *Eco130I* (*StyI*) (Thermo Fisher Scientific). U kandidátních rostlin lze amplifikací tohoto úseku a jeho následnou restrikcí enzymem určit genotyp.

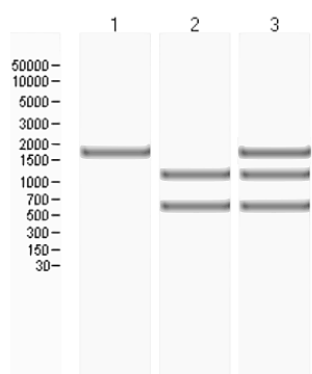
Z kandidátních rostlin byla nejprve izolována DNA pomocí kolonkové soupravy NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, BioTech). Následně došlo k PCR amplifikaci části genové sekvence o velikosti 1703 bp dvojicí oligonukleotidů *Teb_CAPSfw* a *Teb_CAPSRs*. Objemy reagensů PCR směsi a podmínky PCR reakce jsou stejné jako v předešlé podkapitole 4.4.8.1. Úspěšnost amplifikace byla vyhodnocena na 1% agarózovém gelu s přidávkem ethidium bromidu.

Úspěšně naamplifikovaná DNA se poté využívala k restrikci enzymem *Eco130I* ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Objemy reagensů pro digesce jsou uvedeny v Tabulce 16. Digesce probíhala 6 hod při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a byla opět hodnocena v 1–1,5% agarózovém gelu.

Tabulka 16: Složení reakční směsi pro restrikci

Látka	Koncentrace zásobního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem/ pipetované množství
Pufr O	10×	1×	3 μl
Enzym <i>Eco130I</i>	10 $\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	0,33 $\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	1 μl
PCR produkt	-	-	10 μl / 0,1–0,5 μg
ddH ₂ O (nuclease-free)	-	-	Doplnit do 30 μl

U rostliny nesoucí SNP mutaci v genu *TEB* nedocházelo k restrikci naamplifikované DNA – v agarózovém gelu byl vizualizován PCR produkt o celkové velikosti 1703 bp. Pokud byla rostlina heterozygotní, nacházely se na gelu tři produkty o velikostech 1703 bp, 1120 bp a 583 bp. Pokud rostlina nenesla SNP mutaci (WT), byl PCR produkt rozfragmentován na dvě části o velikostech 1120 bp a 583 bp (viz Obrázek 17).



Obrázek 17: Očekávané výsledky gelové elektroforézy po restrikci enzymem *Eco130I* ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)

(1) U rostliny nesoucí homozygotně SNP mutaci v genu *TEB* došlo k zániku restrikčního místa pro enzym *Eco130I*, PCR produkt není fragmentován a jeho velikost činí 1703 bp. (2) U standardní rostliny není přítomná daná mutace v genu *TEB*, nedošlo tedy k zániku restrikčního místa. PCR produkt byl fragmentován enzymem *Eco130I* za vzniku dvou produktů o velikostech 1120 bp a 583 bp. (3) Rostlina má heterozygotní genotyp. Na gelu lze identifikovat tři produkty.

5 VÝSLEDKY

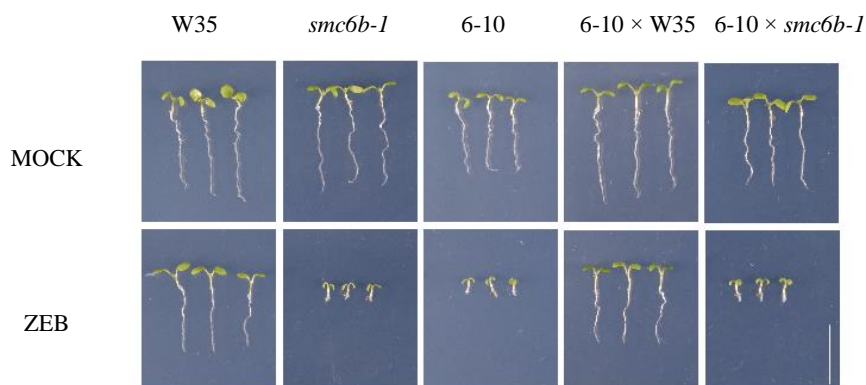
5.1 Kandidátní linie s mutací v genu *SMC6B*

Gen *SMC6B* je lokalizován u huseníčku rolního na 5. chromozomu v pozici 24 714 076–24 721 970 bp. V diplomové práci jsem zkoumala 5 kandidátních linií nesoucích mutaci v genu *SMC6B*. Tři linie (9A-10, 9A-30 a 9A-32) jsem získala dopředným genetickým screenem, jenž byl součástí mého bakalářského výzkumu (Jemelková, 2019). Linie 6-10 byla stejným postupem objevena M.Sc. Karin Kruska (Ruhr University Bochum, Bochum, SRN) a linie 17A-26 Mgr. Klárou Procházkovou.

5.1.1 Komplementační křížení

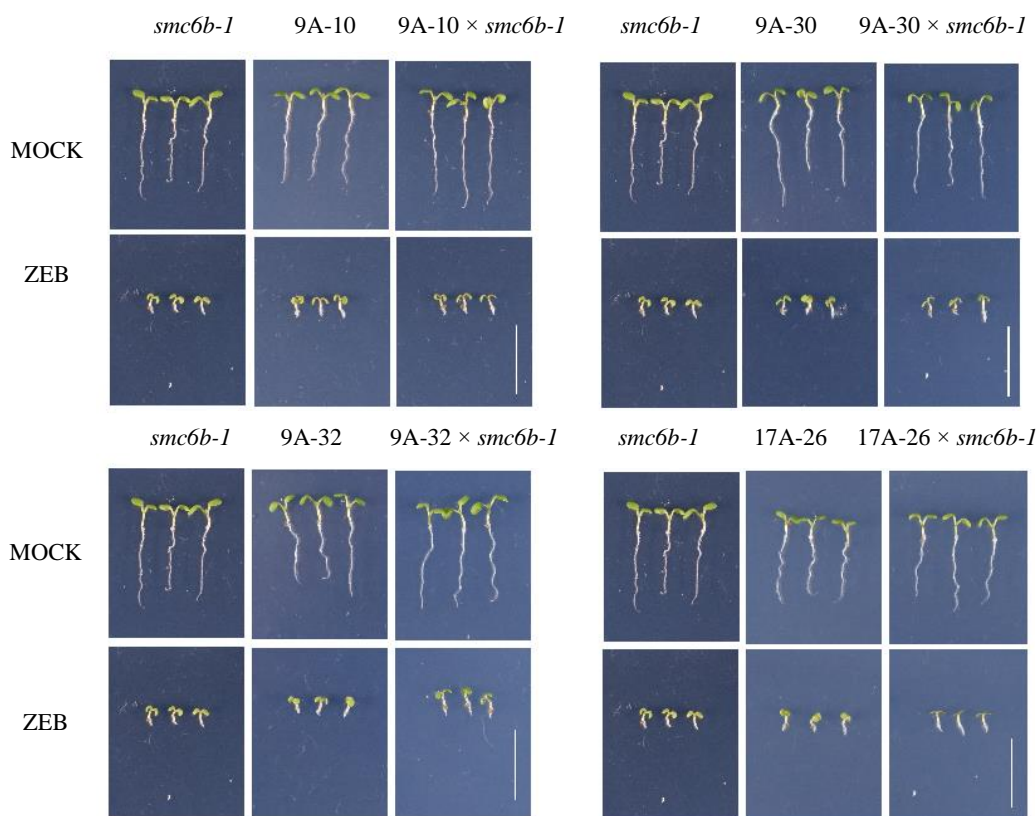
Komplementační křížení odráží genetický přístup, který na základě fenotypové podobnosti F_1 hybridů s parentální generací dává informaci o genetické konstituci křížených linií. Při křížení dvou linií, jež vykazují určitou senzitivitu na $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinu, lze u jejich F_1 hybridů pozorovat dvě fenotypové varianty. Pokud nesou křížené linie mutaci ve stejném genu, budou mít F_1 hybridi na zebularinu stejný senzitivní fenotyp jako původní parentální linie. Pokud dvě křížené linie nesou mutace v rozdílných genech, mutace F_1 hybridů se dostávají do heterozygotního stavu a nedochází k jejich manifestaci – fenotypově se podobají WT.

Kandidátní linie byly kříženy s kontrolní mutantní linií *smc6b-1*, jež vykazuje na $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinu stejný senzitivní fenotyp, a zároveň s nemutovanou linií W35, jež je vůči zebularinu rezistentní. F_1 hybridní semena byla vyseta na 1/2 MS médium bez zebularinu a se zebularinem. Vyhodnocení komplementačního testu bylo provedeno za 7 dní od vysetí semen a spočívalo v porovnání průměrných délek kořínků F_1 hybridů s parentální generací. Komplementační křížení kandidátní linie 6-10 je zobrazeno na Obrázku 18. Komplementační křížení linií 9A-10, 9A-30, 9A-32 a 17A-26 jsou zobrazena na Obrázku 19.



Obrázek 18: Komplementační křížení kandidátní linie 6-10

Kandidátní linie byla křížena s mutantní linií *smc6b-1* a WT linií W35. F_1 hybridní semena byla vyseta na 1/2 MS médium bez zebularinu (MOCK) a s $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinem (ZEB). Na obrázcích jsou znázorněny 7denní rostliny. Křížením linie 6A-10 se senzitivní linií *smc6b-1* vznikli F_1 hybridi (6-10 × *smc6b-1*) mající stejné fenotypové vlastnosti jako parentální generace. Křížením linie 6-10 s WT linií W35 vznikají F_1 hybridi (6-10 × W35), kteří jsou vůči zebularinu rezistentní. U linie 6-10 byla potvrzena mutace v genu *SMC6B*. Měřítka představuje 1 cm.



Obrázek 19: Komplementační křížení kandidátních linií s mutací v genu *SMC6B*

Na obrázcích jsou zobrazena křížení kandidátních linií s T-DNA linií *smc6b-1*. F₁ hybridní semena byla vyseta na 1/2 MS médium bez zebularinu (MOCK) a s 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinem (ZEB). Křížením kandidátních linií se senzitivní linií *smc6b-1* vznikli F₁ hybridi mající stejné fenotypové vlastnosti jako parentální generace. U všech kandidátních linií byla potvrzena mutace v genu *SMC6B*. Měřítko představuje 1 cm.

Na základě komplementačního křížení byla u všech testovaných kandidátních linií potvrzena mutace v genu *SMC6B*, jelikož F₁ hybridi vzniklí komplementací s mutantní linií *smc6b-1* se fenotypově nelišili od parentální generace.

5.1.2 Ověření mutace linie 6A-10

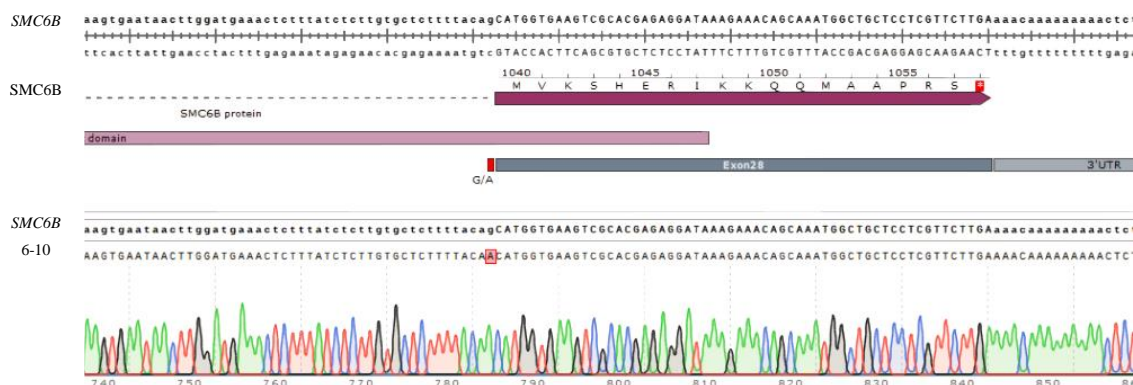
Karin Kruska ve své diplomové práci (Kruska, 2017) určila mutaci linie 6-10 v genomické DNA (gDNA) genu *SMC6B*. Abych na její práci navázala, bylo nutné si přítomnost mutace v gDNA ověřit. V programu SnapGene 5.2 (GSL Biotech LLC) jsem vytvořila strukturu genu *SMC6B*, jenž je u huseničku rolního lokalizován na 5. chromozomu. Gen *SMC6B* má celkovou délku 7894 bp a je rozdělen na 28 exonů. Objevená mutace linie 6-10 by se měla nacházet před exonem 28.

Vyzolovanou gDNA jsem amplifikovala pomocí dvojice primerů pro Produkt 6, které ohraničovaly úsek s očekávaným výskytem mutace (viz Obrázek 20). Úspěšně naamplifikovaný PCR produkt byl přečištěn a poslán do firmy SEQMe na Sangerovo sekvenování, které potvrdilo změnu báze z G na A před exonem 28 v pozici 7362 bp (G7362A) jak je vidět na Obrázku 21.



Obrázek 20: Amplifikace úseku genu SMC6B linie 6-10 s pravděpodobným výskytem mutace

Intron-exonová struktura genu *SMC6B*. Linie 6-10 nese dle výsledků Karin Kruska (2017) mutaci před exonem 28 (G/A). Ověření mutace probíhalo PCR amplifikací primery Produkt 6 fw a Produkt 6 rs.



Obrázek 21: Mutace v gDNA linie 6-10

Mutace linie 6-10 se nachází v akceptorovém místě sestřihu před exonem 28 v pozici G7362A.

Potvrzená mutace se nachází v tzv. akceptorovém místě sestřihu (splice acceptor site), jenž udává spliceozomu hranici mezi intronem a exonem. Pokud dochází v tomto místě ke změně sekvence, nemusí spliceozom při sestřihu rozpoznat začínající exon, což může mít za následek odstranění části kódující sekvence, jejíž deficit ovlivní výsledný protein.

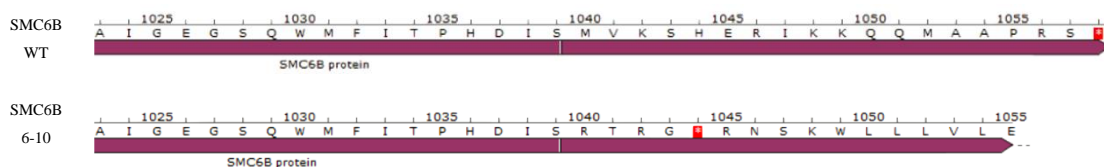
Pro určení efektu na výsledný protein bylo nutné izolovat RNA, jak z linie 6-10, tak z linie W35, a reverzní transkripcí připravit cDNA. Amplifikace cDNA probíhala primery ET278 a SMC6B Produkt 6 rs. Úspěšně naamplifikované a přečištěné PCR produkty o délce ~1900 bp byly opět zaslány na Sangerovo sekvenování do firmy SEQMe. Výsledné sekvence byly hodnoceny v programu SnapGene 5.2 (GSL Biotech LLC).

Sekvenování cDNA linie 6-10 odhalilo částečnou delecí exonu 28 o velikosti 10 bp (viz Obrázek 22). I tato malá delecce zapříčiňuje změnu aminokyselinové sekvence v primární struktuře proteinu – původních 18 aminokyselin (pozice 1040–1058 AA primárního proteinu) bylo nahrazeno jinými aminokyselinami, z nichž jedna v pozici 1044 udává STOP kodon. Výsledný protein je tedy od své původní velikosti zkrácen o 14 aminokyselin (viz Obrázek 23).



Obrázek 22: Delece cDNA u linie 6-10

Změnou báze v akceptorovém místě sestřihu nerozpoznal spliceozom hranici mezi intronem a exonem a vystříhl i 10 bp kódující sekvence exonu 28.

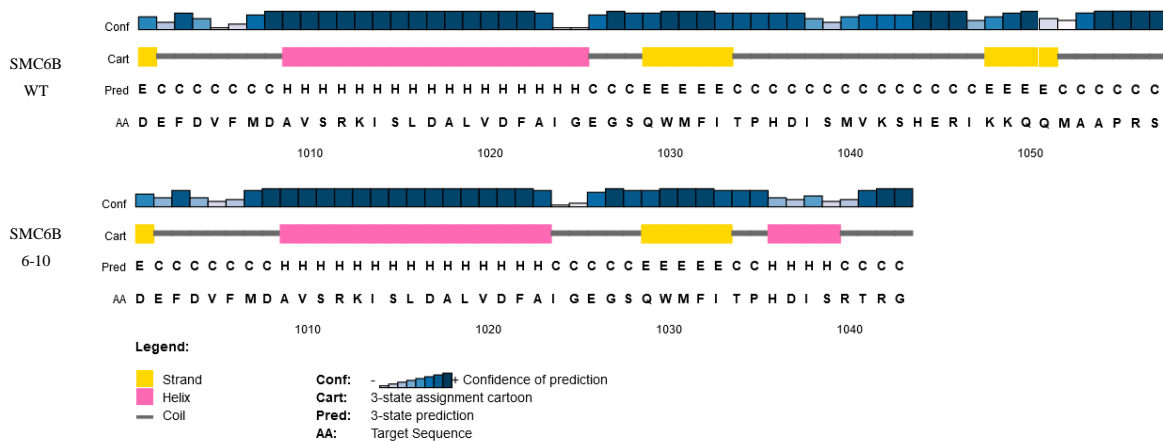


Obrázek 23: Změna v aminokyselinové sekvenci výsledného SMC6B proteinu linie 6-10

Mutace zapříčiňuje kromě aminokyselinových změn v proteinové sekvenci SMC6B u linie 6-10 také vznik předčasného STOP kodonu (1044 AA). Výsledný protein je zkrácen o 14 aminokyselin.

Na konci SMC6B proteinu se nachází Walker B/ATPázová doména. Jedná se o konzervovaný motiv DEFD (1001–1004 AA) a P (1035 AA). Tato funkční doména SMC6B zůstala u linie 6-10 zachována.

Pomocí online aplikace PSIPRED byla analyzována sekundární struktura proteinu SMC6B. V původním SMC6B proteinu je v oblasti 1048–1051 AA predikována sekundární struktura v podobě beta-skládaného listu. Tato aminokyselinová oblast byla u linie 6-10 vlivem mutace deletována. Nepřítomnost této sekundární stuktury může mít vliv na další skládání proteinu, funkčnost ATPázové domény, ale také na interakci SMC6B s jinými proteiny. V sekundární struktuře SMC6B proteinu linie 6-10 v oblasti 1036–1039 AA byla rovněž predikována šroubovice (alfa-helix), avšak konfidence této predikce je výrazně menší.

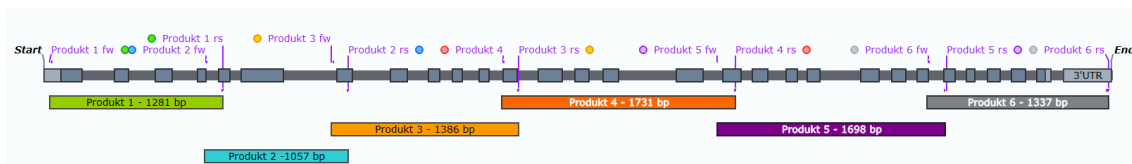


Obrázek 24: Predikce změny sekundární struktury SMC6B u mutace 6-10.

V původním SMC6B je v oblasti 1048–1051 AA predikována sekundární struktura beta skládaný list. Tato struktura je v SMC6B rostlinné linii 6-10 deletována. Zkrácení aminokyselinové sekvence a ztráta posledního beta listu může mít vliv na další skládání proteinu, což by mělo dopad i na ATPázovou doménu Walker B a interakci SMC6B s jinými proteiny. U linie 6-10 je dále v oblasti 1036–1039 AA SMC6B predikována šroubovice (alfa helix), avšak s nižší konfidencí.

5.1.3 Ověření mutací u linií 9A-10, 9A-30, 9A-32 a 17A-26

V programu SnapGene 5.2 (GSL Biotech LLC) jsem vytvořila strukturu genu *SMC6B*, který je u huseničku rolního lokalizován na 5. chromozomu. Gen *SMC6B* má celkovou délku 7894 bp a je rozdělen na 28 exonů. Amplifikace celé genové sekvence najednou by byla obtížná, z toho důvodu byl gen rozdělen na 6 dílčích částí (označeny čísla 1–6), mezi nimiž byly zachovány překryvy (viz Obrázek 25). Tyto úseky se následně amplifikovaly specifickými PCR primery (SMC6B Produkt 1–6 fw + SMC6B Produkt 1–6 rs).

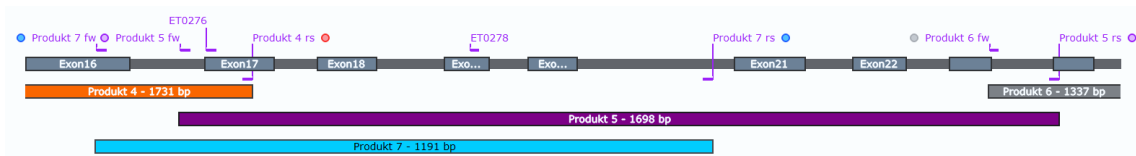


Obrázek 25: Amplifikace genu SMC6B

Intron-exonová struktura genu *SMC6B*. Gen *SMC6B* byl amplifikován 6 PCR reakcemi se specifickými primery (SMC6B Produkt 1–6 fw + SMC6B Produkt 1–6 rs).

Amplifikace produktů 1–4 proběhla úspěšně, stejně jako u produktu 6. Sekvenování těchto úseků však nezjistilo žádnou kauzální mutaci.

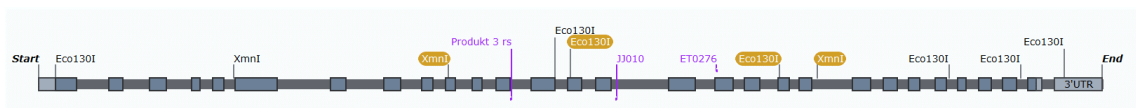
Produkt 5 genu *SMC6B* se mi dle původního plánu u vybraných linií nepodařilo naamplifikovat, naopak amplifikace tohoto úseku u WT linie W35 proběhla zdárně. Částečná amplifikace (Produkt 7) u kandidátních linií nebyla rovněž úspěšná, stejně jako další amplifikace s různou kombinací primerů ET276 a ET278 (viz Obrázek 26). Do kompletní sekvence genu *SMC6B* kandidátních linií chyběl úsek mezi 16.–24. exonem.



Obrázek 26: Amplifikace problematické oblasti genu *SMC6B*

Oblast genu *SMC6B* mezi 16.–24. exonem nebylo možné u vybraných kandidátních linií naamplifikovat. Použité primery jsou značeny světle fialovou barvou.

Vzhledem k tomu, že u WT linie bylo možné tento úsek naamplifikovat, byla stanovena hypotéza, že v daném úseku došlo k přestavbě chromozomu, a to nejspíše k translokaci. Jako vhodnou metodu pro další postup byla zvolena inverzní PCR. Důležitým aspektem bylo vybrání restriktivního enzymu, který se nachází v blízkosti problematického úseku. Byly vybrány dva restriktivní enzymy – *XmnI* (10 bp cutter) se 3 restriktivními místy v genu *SMC6B* a *Eco130I* (6 bp cutter) se 7 restriktivními místy v genu *SMC6B* (viz Obrázek 27). Digesci vybranými enzymy byla vystavena gDNA linií 9A-10, 17A-26 a gDNA kontrolní linie W35.

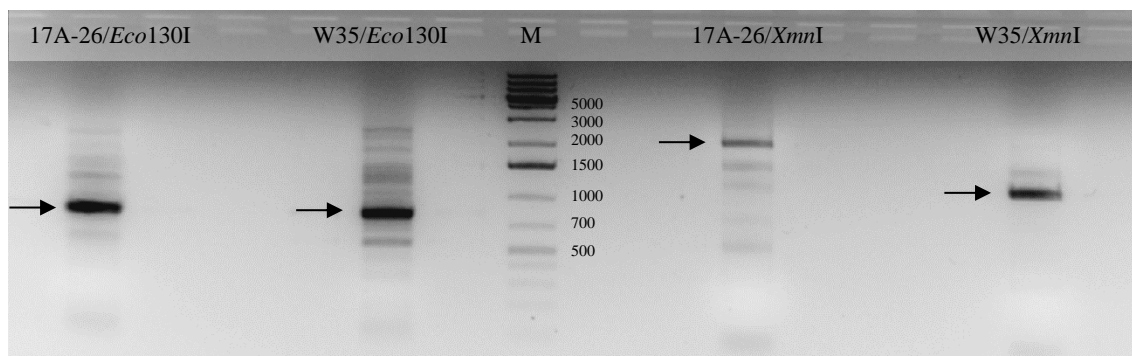


Obrázek 27: Restriktivní místa endonukleázy *XmnI* a *Eco130I* v genu *SMC6B*

Intron-exonová struktura genu *SMC6B*. Restriktáza *Eco130I* (6 bp cutter) má v genu *SMC6B* celkem 7 restriktivních míst, patří mezi častěji štěpící enzymy. Restriktáza *XmnI* (10 bp cutter) má v genu *SMC6B* pouze 3 restriktivní místa, řadí se mezi méně často štěpící enzymy. Žlutě zaznačená restriktivní místa enzymů spadají do problematického úseku. Fialově značeny primery – Produkt 3 rs, JJ010 a ET0276.

DNA fragmenty byly po přečištění kolonkovou soupravou QIAquick PCR purification (Qiagen) ligovány T4 DNA ligázou (Thermo Fisher Scientific) do cirkulární molekuly DNA. Zligovaná DNA byla amplifikována specifickými primery – Produkt 3rs a ET276 (amplifikace gDNA po štěpení enzymem *XmnI*), JJ010 a ET276 (amplifikace gDNA štěpené enzymem *Eco130I*). Objem PCR reakce činil 50 μ l. Amplifikace byla hodnocena na 1,5 % agarózovém gelu s přídavkem ethidium bromidu. Na gel byly nanášeny celé objemy produktu.

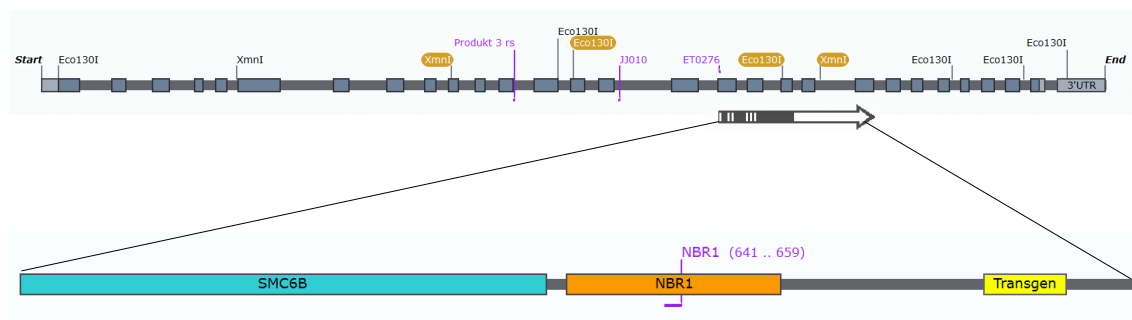
PCR produkt (*Eco130I*) měl u kandidátních linií i kontrolní linie stejnou velikost (~800 bp), což souhlasilo i s bioinformatickým stanovením. PCR produkty (*XmnI*) kandidátních linií 9A-10 a 17A-26 měly odlišnou velikost (~2000 bp) vůči PCR produktu kontrolní linie W35 (~1200 bp). Štěpení restriktivním enzymem *XmnI* se jeví jako přínosnější, jelikož rozdílná velikost produktů naznačovala zánik původního restriktivního místa/přítomnost jiného restriktivního místa, a tedy i změnu sekvence. Jednotlivé PCR produkty, jež byly středem zájmu, byly z agarózového gelu izolovány GeneJET Gel Extraction Kitem (Thermo Fisher Scientific) a následně připraveny na Sangerovo sekvenování (SEQMe).



Obrázek 28: Produkty inverzní PCR

Amplifikace ligovaných fragmentů po štěpení enzymy *Eco130I* a *XmnI*. Zájmové PCR produkty (*Eco130I*) linie 17A-26 a W35 dosahují stejné velikosti (~800 bp). Po štěpení enzymem *XmnI* vznikly po ligaci a amplifikaci u linie 17A-26 a W-35 PCR produkty odlišné velikosti. U linie 17A-26 měl amplifikovaný produkt velikost ~2000 bp, zatímco u linie W35 dosahoval produkt délky ~1500 bp. M – marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Sekvenační analýza potvrdila u kandidátních linií 9A-10 a 17A-26 změnu sekvence za 19. exonem (od pozice 5602 bp genu *SMC6B*). Pomocí algoritmu BLAST bylo zjištěno, že neznámá sekvence pochází ze 4. chromozomu (*SMC6B* se nachází na chromosomu 5) a obsahuje částečnou sekvenci genu *NBR1* (*NEXT TO BRCA1*) (Rodríguez et al., 2014). Část nové sekvence se rovněž skládala z opakujících se repetit GAAG či GAG, které byly na základě homologie přirovnány algoritmem BLAST k sekvenci transgenní linie A huseníčku rolního (5' junction region) (Sawasaki et al., 1998). Vzhledem k tomu, že se tyto repetice v rostlinných genomech nacházejí poměrně často, jedná se patrně pouze o náhodnou podobnost mezi sekvencemi.

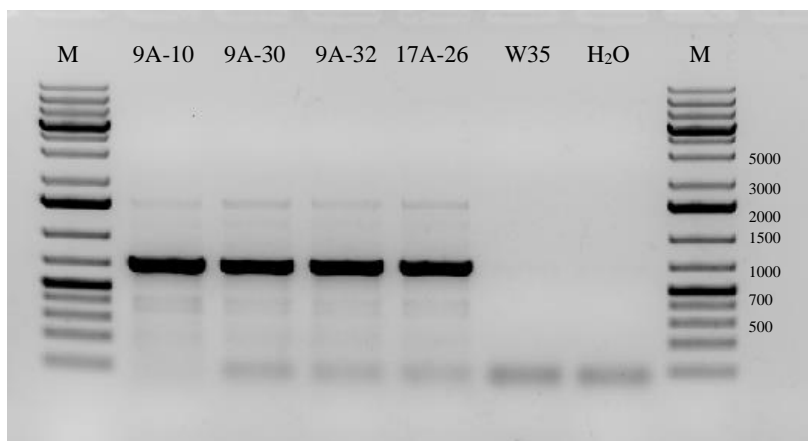


Obrázek 29: Sekvenační analýza PCR produktu kandidátních linií

Nahore: Intron-exonová struktura genu *SMC6B* s restrikčními místy pro enzymy *Eco130I* a *XmnI*. Fialovou barvou značeny primery. Aligment produktu z inverzní PCR po štěpení enzymem *XmnI* je znázorněn šipkou. Totožná sekvence s genem *SMC6B* je v šípce značena černě, bílá oblast šipky značí odlišnou sekvenci.

Dole: Sekvenační analýzou a následným BLAST algoritmem byla u kandidátních linií zjištěna změna sekvence genu *SMC6B*. Translokovaná sekvence genu *NBR1* (Rodríguez et al., 2014) pocházela ze 4. chromozomu.

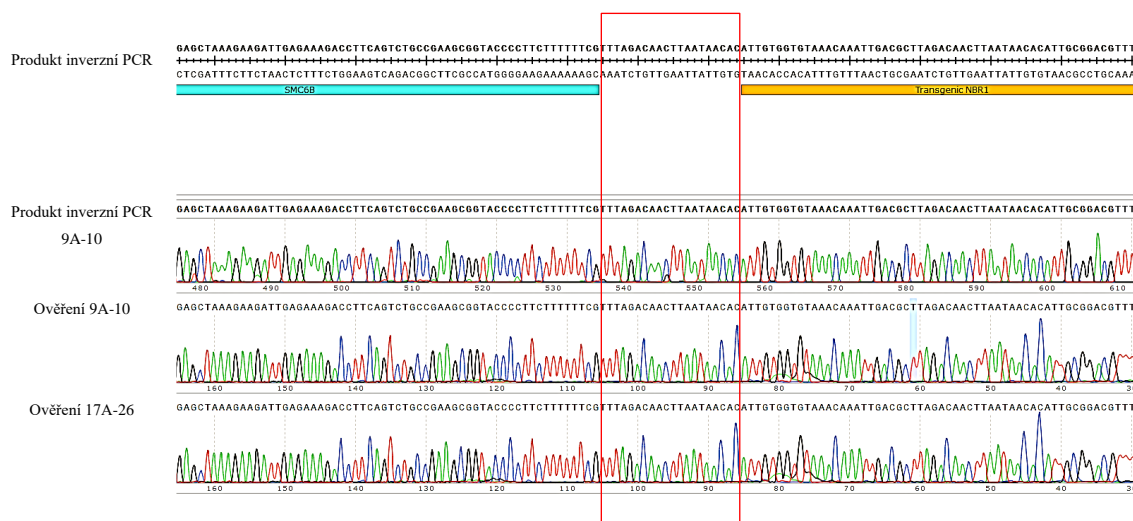
Chromozomovou přestavbu bylo nutné ověřit klasickou PCR amplifikací v gDNA kandidátních linií 9A-10, 9A-30, 9A-32 a 17A-26. Jako negativní kontrola byla využita gDNA linie W35, u níž se aberace nevyskytuje. Při amplifikaci byl využit navržený primer NBR1 rs, jenž leží v translokované oblasti, a jeho amplifikačním partnerem se stal primer ET276. Chromozomová přestavba byla potvrzena u všech kandidátních linií. U linie W35 dle očekávání nevyšel žádný produkt (viz Obrázek 30).



Obrázek 30: PCR amplifikace gDNA s primerem spadajícím do translokované oblasti

U linií 9A-10, 9A-30, 9A-32 a 17A-26 došlo k naamplifikování gDNA primery ET276 a NBR1 rs. Primer ET276 je lokalizován do genu *SMC6B* (chromozom 5), zatímco primer NBR1 rs leží v genu *NBR1* (původní lokalizace chromozom 4). Amplifikace gDNA kandidátních linií potvrdila chromozomovou přestavbu. U linii W35 se přestavba chromozomů nevyskytuje, z toho důvodu nedošlo k amplifikaci. M – marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), H₂O – negativní kontrola.

PCR produkty linií 9A-10 a 17A-26 byly opětovně izolovány z gelu a po purifikaci byly odeslány na sekvenování (SEQMe). Důležitý parametr byl přechod mezi sekvencemi genu *SMC6B* a *NBR1*. Výstup ze sekvenování je znázorněn na Obrázku 31.



Obrázek 31: Sekvenační analýza potvrzující chromozomovou přestavbu u kandidátních linií

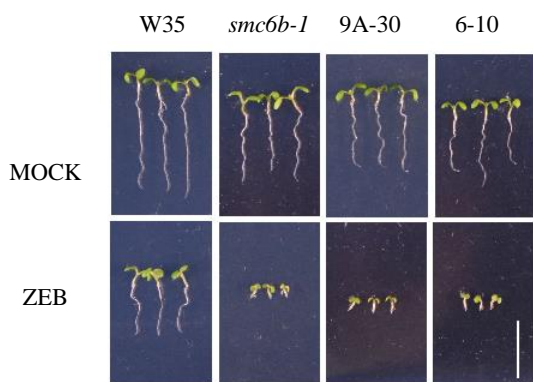
Chromozomální přestavba byla u kandidátních linií potvrzena klasikou PCR amplifikací a sekvenací vzniklých PCR produktů. V rámečku zaznačen přechod, kde došlo k přerušení sekvence genu *SMC6B*.

Výskyt stejné mutace u linií 9A byl pravděpodobný, jelikož pocházejí z jedné sbírky (batche), která obsahovala přibližně 100 M1 rostlin. Téměř jistě se jedná o potomky stejné M1 mateřské rostliny. U linii 17A-26 byl výskyt přestavby překvapivý, jelikož linie vychází z nezávislé mutantní sbírky. Nejpravděpodobnější příčinou je kontaminace semenem ze sbírky 9A.

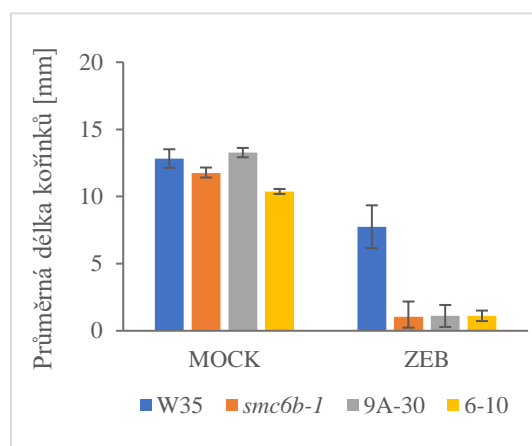
5.1.4 Testování senzitivity linií 6-10, 9A-30 a *smc6b-1* vůči zebularinu

Statistická analýza senzitivity vůči $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinu byla provedena pouze na liniích 6-10, 9A-30 a na kontrolních liniích *smc6b-1* a W35. Test byl proveden ve třech opakováních, přičemž v jednom kole bylo hodnoceno 30 rostlin z každé linie. Hodnocení senzitivity probíhalo 7 dní od vysetí semen. Vzhledem k tomu, že linie 9A-10, 9A-32 a 17A-26 nesou stejnou mutaci jako linie 9A-30, byl pro každou z nich zhotoven jeden replikát, který však do výsledné statistiky v této podkapitole není zahrnut.

Všechny linie s mutací *smc6b* vykazovaly na zebularinu vysokou míru senzitivity. Průměrná délka kořenů těchto linií se na $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinu pohybuje do 1,5 mm (viz Obrázek 32). Průměrné délky kořínků testovaných linií na kontrolním médiu (MOCK) a s $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinem (ZEB) jsou zobrazeny v Grafu 1.



Obrázek 32: Testování senzitivity linií *smc6b* vůči zebularinu



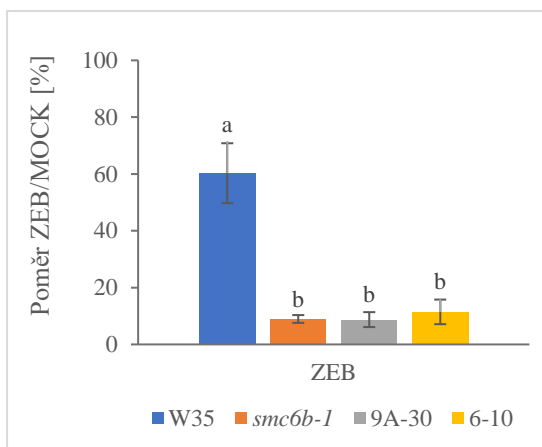
Graf 1: Průměrné délky kořínků testovaných *smc6b* linií na zebularinu

Obrázek 32: Na obrázku jsou zobrazeny 7denní rostliny linií s mutací v genu *SMC6B* (*smc6b-1*, 9A-30 a 6-10), jež byly vysazeny na kontrolní 1/2 MS médium (MOCK) a na médium s $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinem (ZEB). Linie W35 slouží jako negativní kontrola, *smc6b-1* představuje zároveň pozitivní kontrolu. Měřítka značí 1 cm.

Graf 1: V grafu jsou zaznamenány průměrné délky [mm] kořínků 7denních testovaných rostlin na kontrolním médiu (MOCK) a na $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinu (ZEB).

Statistická analýza vycházela z poměru průměrných délek kořenů chemikálie/mock. Kořeny *smc6b* linií dosahovaly na médiu se zebularinem max. 9 % délky než na kontrolním médiu.

Získané poměry sloužily ke vzájemnému porovnání rostlinných linií a hodnocení senzitivity. Výsledné hodnoty byly využity pro jednofaktorovou analýzu rozptylu ANOVA (Analysis of Variance) a následně Tukeyův-HSD test („honestly“ significant difference test) umožňující mnohonásobné porovnání (program Minitab). Za statisticky signifikantní byly brány výsledky s $P \leq 0,05$. Získané poměry délek [%] a výsledky mnohonásobného porovnání jsou zobrazeny v Grafu 2.



Graf 2: Poměr délek kořínků zebularin/mock u *smc6b* linií

Zobrazeny jsou poměry délek kořínků testovaných linií na $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinu (ZEB) vůči 1/2 MS médiu (MOCK). Hodnoty značené stejným písmenem nevykazují dle Tukeyho testu signifikantní odlišnost ($P \leq 0,05$).

Rozdíly poměrů délek ZEB/MOCK nebyly u jednotlivých linií *smc6b* signifikantní a dle Tukeyho testu spadají do jedné skupiny, na rozdíl od linie W35, která je vůči zebularinu téměř rezistentní. Linie W35 dosahuje na médiu s $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinem 60% délky než na kontrolním 1/2 MS médiu (MOCK).

Mutace linií 6-10 a 9A-30 v genu *SMC6B* ovlivňují funkčnost výsledného proteinu. Vyřazení podjednotky SMC6B má dopad i na celistvý komplex SMC5/6, který v důsledku toho nemůže plnit své funkce. Výsledky potvrzují, že SMC5/6 komplex má nezbytnou roli v opravě DNA-proteinových komplexů indukovaných zebularinem.

5.2 Kandidátní linie s mutací v genu *TEBICHI*

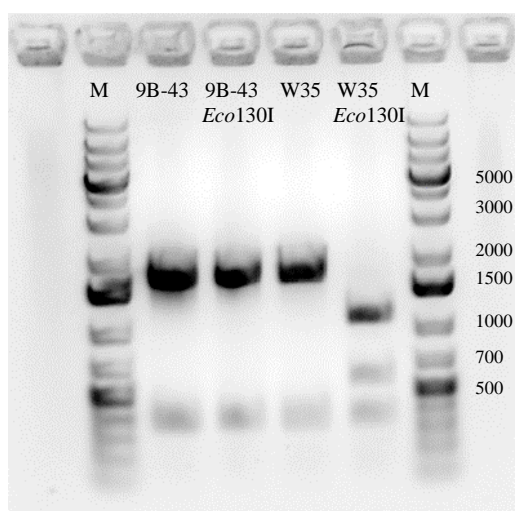
Gen *TEBICHI* je u huseníčku rolního lokalizován na 4. chromozomu v pozici 15 767 185–15 779 697 bp a skládá se z 26 exonů. Celková délka genu činí 12 513 bp. U kandidátní linie 9B-43 byla mutace v genu *TEBICHI* zjištěna celogenovým sekvenováním, které bylo provedeno na odvozené F₂ mapovací populaci (Jemelková, 2019). Mutace linie 9B-43 byla lokalizována na 4. chromozomu a zasahovala do genu *TEB* (G2565A). Mutace byla ověřována komplementačním křížením s mutantní linií *teb-1* (Inagaki et al., 2006) a PCR amplifikací. Selektce mutantní homozygotní linie 9B-43 spočívala ve využití CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) markeru.

5.2.1 Selektce homozygotních mutantů 9B-43 pomocí CAPS markeru

Vzhledem k tomu, že M₃ generace linie 9B-43 částečně segregovala, bylo nutné vyselektovat na základě výsledků z celogenového sekvenování homozygotní mutantní jedince a odstranit heterozygotní zástupce. Genotyp rostlin byl zjišťován pomocí CAPS markeru.

Mutace v genu *TEB* (G2565A) zapříčinila zánik restrikčního místa pro enzym *Eco130I*. Oblast s vyskytující se mutací byla u testovaných rostlin a kontrolní linie amplifikována dvojicí primerů (Teb_CAPSfw a Teb_CAPSRs) a následně štěpena enzymem *Eco130I* (viz kapitola 4.4.8.2). Gelová elektroforéza odhalila genotypy jednotlivých testovaných rostlin.

U rostliny nesoucí SNP mutaci v genu *TEB* nedocházelo k restrikci naamplifikované DNA – v agarózovém gelu byl vizualizován PCR produkt o celkové velikosti 1703 bp. Tyto zvalidované rostliny pak sloužily k propagaci semen. Pokud byla rostlina heterozygotní, nacházely se na gelu tři produkty o velikostech 1703 bp, 1120 bp a 583 bp. Pokud rostlina nenesla SNP mutaci (WT), byl PCR produkt rozfragmentován na dvě části o velikostech 1120 bp a 583 bp.



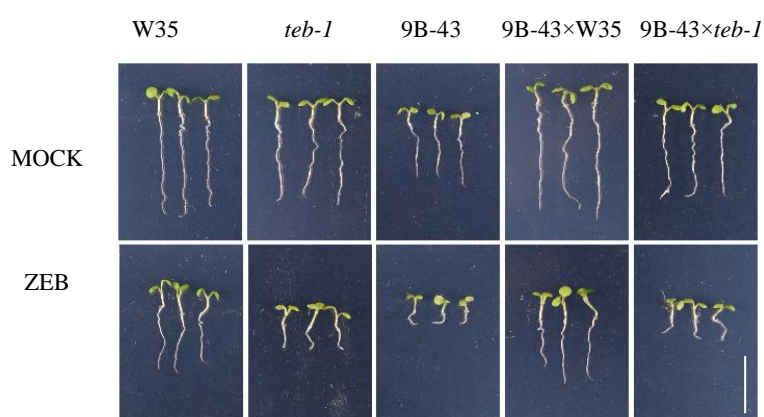
Obrázek 33: Selektce homozygotních mutantů 9B-43 pomocí CAPS markeru

Amplifikovaná DNA rostliny 9B-43 nebyla štěpena enzymem *Eco130I*. Tato rostlina nese homozygotní mutaci v genu *TEB* zapříčiňující zánik restrikčního místa pro použitý enzym. Amplifikovaná DNA kontrolní linie W35 byla naštěpena enzymem *Eco130I* dle očekávání.

5.2.2 Ověření mutace 9B-43 komplementačním křížením

Před samotným komplementačním křížením byla nutná genotypizace a selekce homozygotních mutantních zástupců linie *teb-1*. V genu *TEB* nesou rostliny linie *teb-1* 2,7 kb delecí mezi 7. až 13. exonem. Genotypizace byla provedena PCR amplifikací (viz kapitola 4.4.8.1). Homozygotní jedinci byli propagováni do další generace (zisk semen).

Kandidátní linie 9B-43 byla křížena s mutantní linií *teb-1*, jež vykazuje na $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinu podobný senzitivní fenotyp, a zároveň s nemutovanou linií W35, jež je vůči zebularinu rezistentní. F₁ hybridní semena byla vyseta na 1/2 MS médium bez zebularinu a se zebularinem. Porovnání délek kořínků F₁ hybridů s parentální generací bylo provedeno 7. den od vysetí. Komplementační křížení je zobrazeno na Obrázku 34.



Obrázek 34: Komplementační křížení linie 9B-43

Linie 9B-43 byla křížena s mutantní linií *teb-1* a WT linií W35. F₁ hybridní semena byla vyseta na 1/2 MS médium bez zebularinu (MOCK) a s $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zebularinem (ZEB). Na obrázcích jsou znázorněny 7denní rostliny. Křížením linie 9B-43 s linií *teb-1* vznikli F₁ hybridní mající stejné fenotypové vlastnosti jako parentální generace. Křížením linie 9B-43 s WT linií W35 vznikají rezistentní F₁ hybridní. U linie 9B-43 byla potvrzena mutace v genu *TEB*. Měřítka na jednotlivých snímcích představuje 1 cm.

Komplementační testování potvrdilo u linie 9B-43 mutaci v genu *TEB*. F₁ hybridní potomstvo linie *teb-1* a 9B-43 vykazovalo stejný fenotyp jako původní parentální generace.

5.2.3 Ověření mutace 9B-43 PCR amplifikací a sekvenováním

Celogenomové sekvenování linie 9B-43 odhalilo mutaci na chromozomu 4 v genu *TEB*, kde v exonu 4 došlo k záměně bází z G na A v pozici 2565 (G2565A). Mutace byla ověřována standardní PCR amplifikací s využitím primerů *Teb_4E_fw* a *Teb_5E_rs* (viz Obrázek 35). PCR produkty byly sekvenovány Sangerovou metodou firmou SEQMe. Výsledky sekvenční analýzy jsou zobrazeny na Obrázku 36.



Obrázek 35: Amplifikace úseku genu *TEBICH1* linie 9B-43 s výskytem mutace

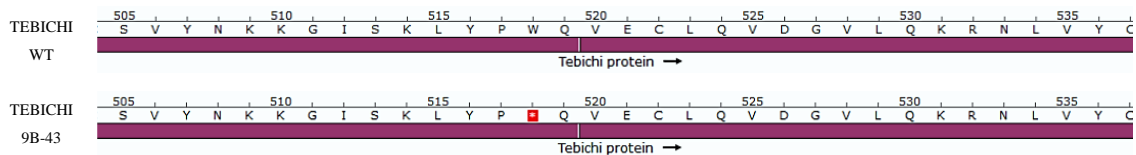
Šedě znázorněna intron-exonová struktura genu *TEB*. Purpurově značena proteinová struktura *TEB* s helikázovou a DNA polymerázovou doménou. Světle fialovou barvou jsou značeny použité oligonukleotidy umožňující amplifikaci úseku s výskytem mutace.



Obrázek 36: Potvrzení mutace linie 9B-43 Sangerovým sekvenováním

Mutace linie 9B-43 se nachází v exonu v pozici 2565 bp genu *TEB* (G2565A).

Mutace linie 9B-43 v genu *TEB* byla Sangerovým sekvenováním potvrzena. Změna báží (G/A) v pozici 2565 bp měla vliv na výslednou aminokyselinovou sekvenci. Původní aminokyselina tryptofan (518 AA) byla nahrazena předčasným STOP kodonem. Při translaci vzniká nefunkční produkt *TEB* s deficiencí helikázové i polymerázové domény.



Obrázek 37: Změna v aminokyselinové sekvenci výsledného *TEB* proteinu linie 9B-43

V aminokyselinovém řetězci u linie 9B-43 došlo ke změně tryptofanu (518 AA) na STOP kodon. Výsledný proteinový produkt je tedy zkrácen o 1637 aminokyselin a potýká se s deficiencí helikázové a polymerázové domény.

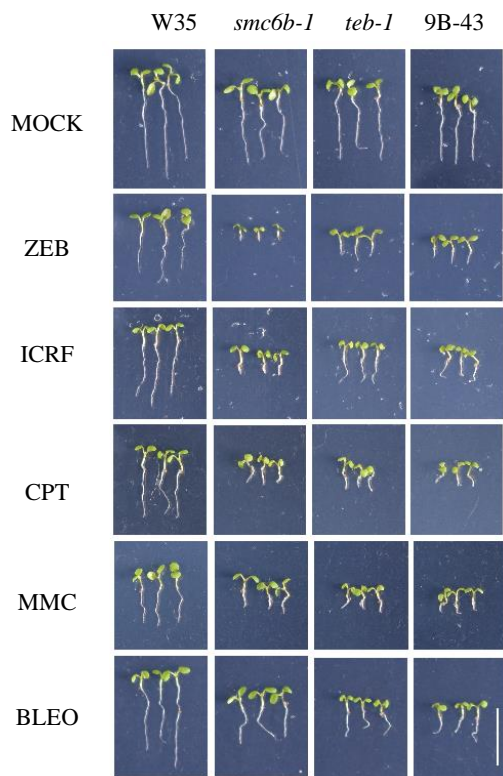
5.2.4 Testování senzitivity linií 9B-43 a *teb-1* na chemikáliích

Linie 9B-43 a *teb-1* byly testovány na chemikáliích poškozující DNA ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZEB, $20 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CPT, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ICRF-187, $50 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BLEO a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC). Při testování byly využity také kontrolní linie W35 a *smc6b-1*. Test byl proveden ve třech opakováních, přičemž v jednom kole bylo hodnoceno 30 rostlin z každé linie. Hodnocení senzitivity probíhalo 7 dní od vysetí semen.

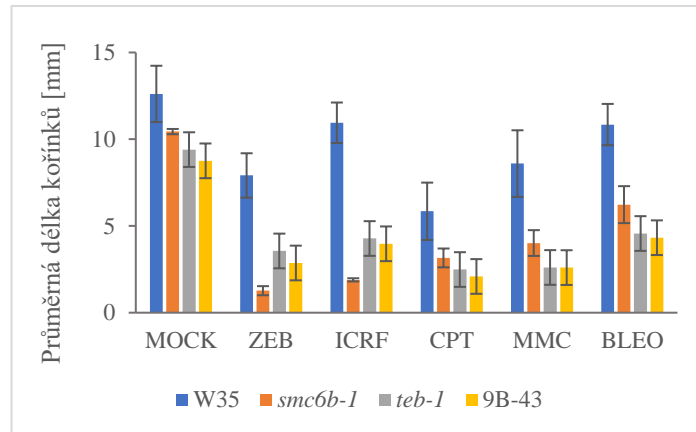
Pro každou rostlinnou linii byl důležitým parametrem poměr průměrných délek kořínku na médiu s chemikálií a na kontrolním 1/2 MS médiu. Tento poměr sloužil ke vzájemnému

porovnání rostlinných linií a hodnocení senzitivity. Výsledné hodnoty byly využity pro jednofaktorovou analýzu rozptylu ANOVA (Analysis of Variance) a následně Tukeyův-HSD test („honestly“ significant difference test) umožňující mnohonásobné porovnání (program Minitab). Za statisticky signifikantní byly brány výsledky s $P \leq 0,05$.

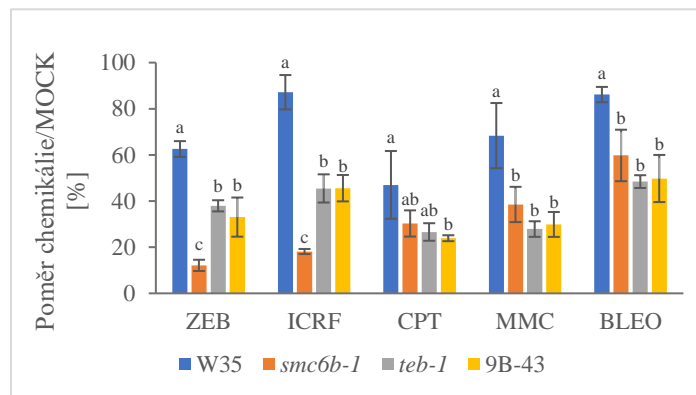
Na Obrázku 38 jsou zobrazeny 7denní rostliny, které byly vystaveny jednotlivým chemikáliím. Průměrné délky kořínků [mm] rostlinných linií na kontrolním médiu (MOCK) a na chemikáliích jsou zobrazeny v Grafu 3. Výsledný poměr délek kořínků chemikálie/mock je uveden v Grafu 4.



Obrázek 38: Testování senzitivity linií 9B-43 a *teb-1* na vybraných chemikáliích



Graf 3: Průměrné délky kořínků testovaných *teb* linií na chemikáliích



Graf 4: Poměr délek kořínků chemikálie/mock u *teb* linií

Obrázek 38: Na obrázku jsou zobrazeny 7denní rostliny s mutací v genu *TEB* (9B-43 a *teb-1*), jež byly vysazeny na chemikálie poškozující DNA. MOCK je označení pro kontrolní médium bez chemikálie (1/2 MS). Rostlinná linie W35 slouží jako negativní kontrola, *smc6b-1* jako pozitivní kontrola. Měřítka představuje 1 cm.

Graf 3: V grafu jsou zaznamenány průměrné délky [mm] kořínků 7denních testovaných rostlin na jednotlivých chemikáliích. MOCK představuje kontrolní médium bez chemikálie (1/2 MS).

Graf 4: Zobrazeny jsou poměry délek kořínků testovaných linií na chemikálii vůči 1/2 MS médiu (MOCK). Hodnoty značené stejným písmenem nevykazují dle Tukeyho testu signifikantní odlišnost ($P \leq 0,05$).

Použité chemikálie vyvolávají rozmanitou škálu poškození. Účinky zebularinu již byly popsány v literárním přehledu. CPT způsobuje rovněž vznik DPCs, avšak interaguje s TOP1. CPT stabilizuje vazbu tyrosyl-fosfodiesteru mezi TOP1 a DNA. Vzniklý DPCs je často doprovázen SSBs (Hsiang et al., 1985; Pommier, 2009).

ICRF-187 je schopný blokovat mitózu (Sharpe et al., 1970). Inhibuje TOP2 za vzniku DNA-proteinového komplexu. Poškození je doprovázeno vznikem DSBs (Sehested et Jensen, 1996).

MMC je alkylační činidlo, které v molekule DNA způsobuje transformaci N⁷- nebo O⁶-guaninu na MMC-mono-dG. Výsledný adukt je schopen interagovat s jinými bázemi DNA za vzniku interstrand crosslinků (Fu et al., 2012).

Radiomimetické antibiotikum BLEO stejně jako ionizující záření dokáže štěpit DNA. Po aktivaci metalovým iontem vytváří peroxidové radikály a indukuje vznik SSBs, DSBs nebo abazických míst (Povirk, 1996; Ma et al., 2009). Účinky BLEO ovlivňují buňky nezávisle na fázi buněčného cyklu a efektivně u nich spouštějí expresi genů zúčastňujících se reparace indukovaného poškození (Houser et al., 2001; De Schutter et al., 2007; Pecinka et al., 2009; Adachi et al., 2011).

Rostlinné linie s mutací v genu *TEB*, stejně jako kontrolní linie *smc6b-1*, vykazovaly na všech chemikáliích určitou míru senzitivity. Testem bylo dokázáno, že TEB se může podílet nejen na reparaci DPCs, ale také SSBs, DSBs a DNA komplexů.

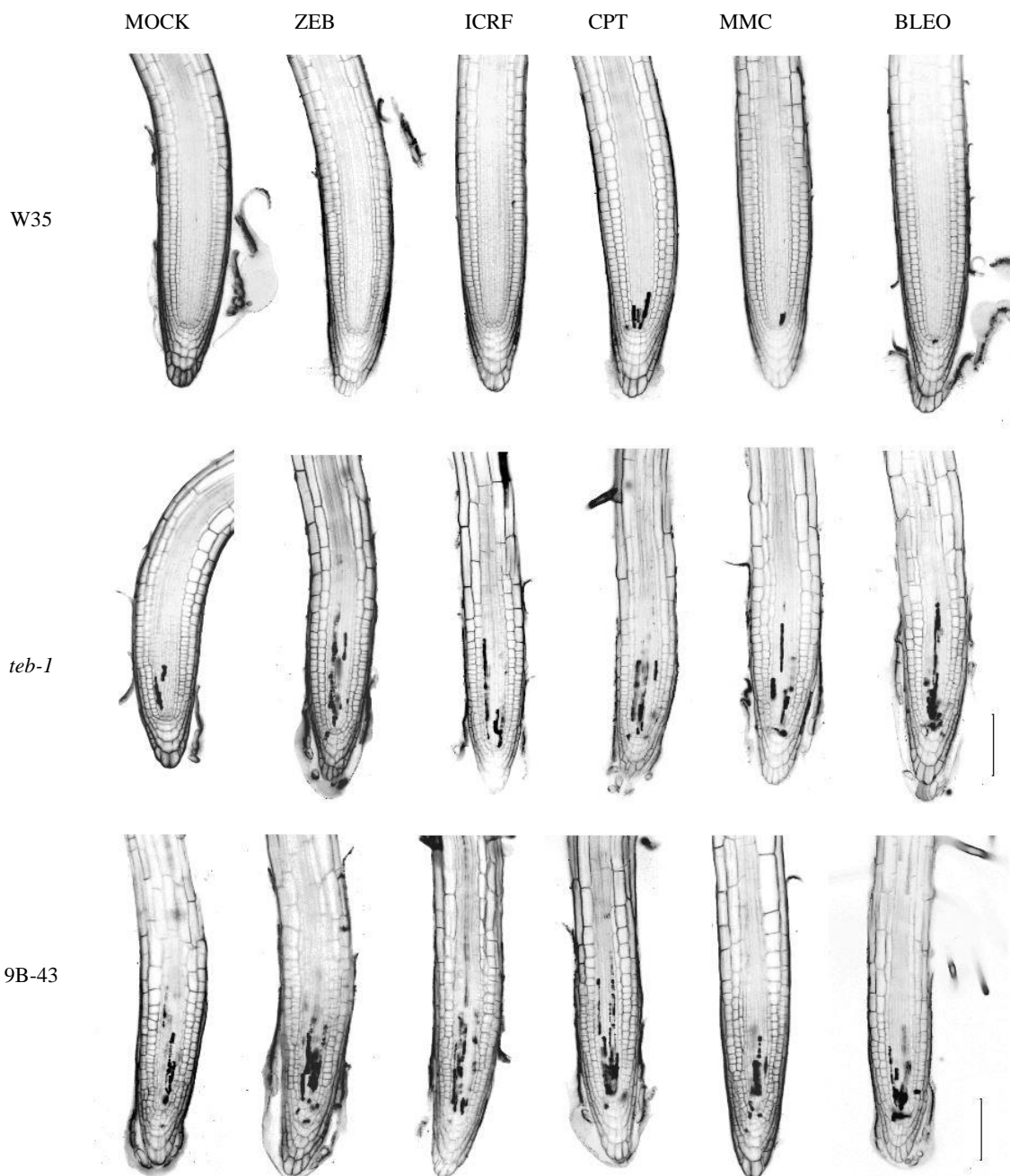
MMEJ (aNHEJ), kterého je TEB aktérem, představuje relativně nedávno objevenou reparační dráhu nezávislou na LIG4 (Deriano et Roth, 2013). Podmínkou reparace je přítomnost mikrohomologních sekvencí o délce 5–25 bp a DSBs (Decottignies, 2013).

5.2.5 Analýza buněčné smrti v kořenovém meristému linií 9B-43 a *teb-1*

Analýza buněčné smrti byla provedena na 6denních semenáčcích, které nejprve po dobu 5 dnů rostly na tuhém 0,8% 1/2 MS médiu a následně byly přeneseny do tekutého 1/2 MS média bez přídavku chemikálie a s jednotlivými chemikáliemi – 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZEB, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ICRF-187, 20 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CPT, 50 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BLEO a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC. Po 12–24 hod inkubaci byly připraveny preparáty přenesením rostlin na podložní sklíčko s propidium jodidem (100 \times), který se interkaloval do poškozených buněk v kořenovém meristému. Pro vizualizaci poškozených buněk byl použit konfokální mikroskop Leica TCS SP8 (Leica Microsystems).

U kontrolní linie W35 bylo možné sledovat pravidelné uspořádání kořenového meristému. Buněčná smrt byla zaznamenána v malé míře pouze na CPT, MMC a BLEO (viz Obrázek 39).

Zóna kořenového apikálního meristému u linií *teb-1* i 9B-43 byla v porovnání s kontrolní linií W35 zkrácena. Kořenové apikální meristémy linií *teb-1* i 9B-43 vykazovaly již na kontrolním médiu (MOCK) morfologické defekty. Individuální buněčné typy (QC a přilehlé kmenové buňky) bylo v některých případech obtížné rozeznat. Rovněž zde byla zaznamenána buněčná smrt. Po přídavku jednotlivých chemikálií došlo v meristémech těchto linií k nárůstu buněčné smrti. Intenzivnější buněčná smrt byla pozorována zejména na ZEB, ICRF-187, CPT a BLEO.



Obrázek 39: Analýza buněčné smrti v kořenovém meristému linií 9B-43 a *teb-1*

Na obrázku jsou zobrazeny kořeny 6denních semenáčků linií W-35, *teb-1* a 9B-43, které byly po dobu 5 dnů nejprve pěstovány na 0,8% 1/2 MS médiu a následně 12 hod inkubovány v tekutém 1/2 MS médiu bez chemikálie (MOCK) a s jednotlivými chemikáliemi ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZEB, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ICRF-187, $50 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BLEO a $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC). Poškozené buňky v kořenech se jeví tmavě. Měřítka na snímcích představuje $100 \mu\text{m}$.

Výsledky potvrzují zapojení TEB do reparace různých poškození DNA, jako jsou DPCs, SSBs, DSBs, ale pravděpodobně i DNA-komplexy. Z analyzovaných výsledků také vyplývá, že již samotná deficeence TEB má negativní vliv na vývoj apikálního kořenového meristému.

5.2.6 Tvorba dvojitých mutantních linií a jejich selekce

Tvorbě dvojitých mutantních linií předcházela selekce jednoduchých mutantů pomocí PCR genotypizace. Kromě homozygotní *teb-1* linie, byly vyselektovány homozygotní reportérové linie *recB* a *recE*, homozygotní T-DNA linie *smc6b-1*, *rtel1-1*, *fan1-1*, *mus81-1*, *lig4* a *ku70*.

Homozygotní T-DNA i reportérové linie byly následně kříženy s homozygotní linií *teb-1*. Dle 1. Mendelova zákona se předpokládalo, že F₁ populace těchto hybridů bude fenotypově i genotypově uniformní. V obou sledovaných alelách se tedy v F₁ generaci předpokládal heterozygotní stav.

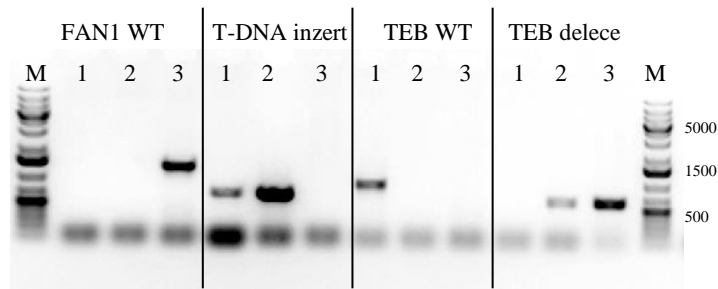
V F₂ populaci bylo možné sledovat dvojitě homozygoty, jejichž zastoupení bylo v celé populaci procentuálně nejmenší (6,25 %). F₂ hybridní semena byla nejprve vyseta na 5 μmol·l⁻¹ ZEB umožňující selekci na základě fenotypu. Po týdnu byli senzitivní hybridní kandidáti přesazeni na 0,6% 1/2 MS médium. Třítýdenní hybridy byli zasazeni do zeminy a opětovně genotypováni.

PCR genotypizací byl v F₂ generaci nalezen pouze jeden dvojitý homozygot *teb-1 fan1-1*. Zbylé genotypované rostliny nesly často jednu alelu homozygotní, druhou heterozygotní. Nicméně i z těchto vyselektovaných rostlin byla získána F₃ hybridní semena. Genotypizace byla stejným způsobem provedena i na F₃ populaci.

Na F₃ populaci *teb-1 fan1-1* byla provedena „bulk“ PCR genotypizace. Z 20 rostlin *teb-1 fan1-1* byla hromadně izolována gDNA do jedné zkumavky pomocí kolonkové soupravy NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, BioTech), která pak byla využita pro PCR genotypizaci. Při PCR amplifikaci se využívaly 4 kombinace primerů – 2 kombinace pro alelu *FAN1* (WT a T-DNA inzert) a 2 kombinace pro alelu *TEB* (WT a delece). Použité primery jsou pro přehlednost uvedeny v Tabulce 17. Kontrolní amplifikace byla rovněž provedena na gDNA homozygotních rostlin *fan1-1* a *teb-1*. Výsledky genotypizace jsou uvedeny na Obrázku 40.

Tabulka 17: Genotypizace *teb-1 fan1-1*

Gen	Mutantní alela	WT alela		T-DNA inzert	
		Forward	Reverse	Forward	Reverse
<i>FAN1</i> AT1G48360	<i>fan1</i> , GK_815C08	ET0028	ET0029	ET0028	ET0032
TEB AT4G32700	<i>teb-1</i> Inagaki et al, 2006	<i>teb-1</i> WT fw	<i>teb-1</i> WT rs	<i>teb-1</i> WT fw	<i>teb-1</i> deletion rs

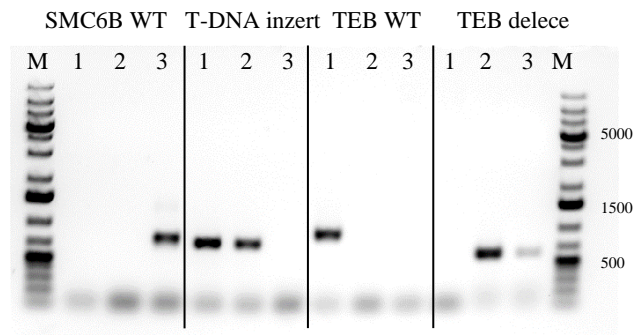


Obrázek 40: Genotypizace *teb1 fan1-1*

Vzorek 1 – gDNA *fan1-1*, vzorek 2 – bulk gDNA *teb-1 fan1-1*, vzorek 3 – gDNA *teb-1*. M – marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

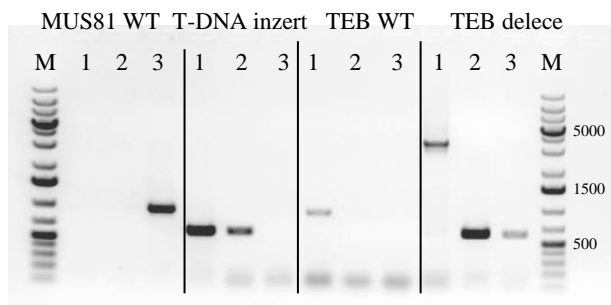
Bulk PCR genotypizací bylo ověřeno, že získaná linie *teb-1 fan1-1* nese mutaci v obou genech. Tato linie je připravena pro další analýzu, která by mohla objasnit funkční vztahy TEB a FAN1 při reparaci DNA-proteinových komplexů, případně i interstrand crosslinků (Herrmann et al., 2015).

V F₃ generaci byly dále vyselektovány dvojitě mutantní homozygotní rostliny – *teb-1 smc6b-1* (viz Obrázek 41) a *teb-1 mus81-1* (viz Obrázek 42), které budou propagovány do generace F₄, na níž by se měla analyzovat přítomnost dvojitě mutace pomocí „bulk“ PCR genotypizace. Po pozitivním ověření by tyto linie opět sloužily pro analýzu funkčních vztahů a objasnění reparace DNA-proteinových komplexů. S ohledem na časovou náročnost se mi jiné dvojitě mutantní homozygotní linie nepodařilo vyselektovat.



Obrázek 41: Genotypizace *teb-1 smc6b-1*

Vzorek 1 – gDNA *smc6b-1*, vzorek 2 – gDNA *teb-1 smc6b-1*, vzorek 3 – gDNA *teb-1*. M – marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).



Obrázek 42: Genotypizace *teb-1 mus81-1*

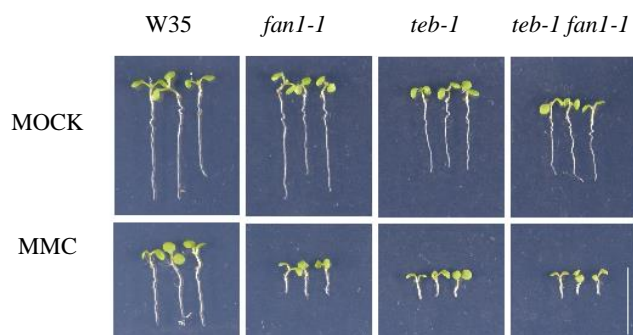
Vzorek 1 – gDNA *mus81-1*, vzorek 2 – gDNA *teb-1 mus81-1*, vzorek 3 – gDNA *teb-1*. M – marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

5.2.7 Analýza linie *teb-1 fan1-1*

Ze studie Herrmann et al. (2015) vyplývá, že nukleáza FAN1-1 je zapojena do oprav interstrand crosslinků a mutantní linie vykazují senzitivitu vůči MMC. FAN1-1 má 5'→3' exonukleázovou aktivitu a dokáže štěpit každý třetí nukleotid v místě poškození (Kurzbauer et al., 2018).

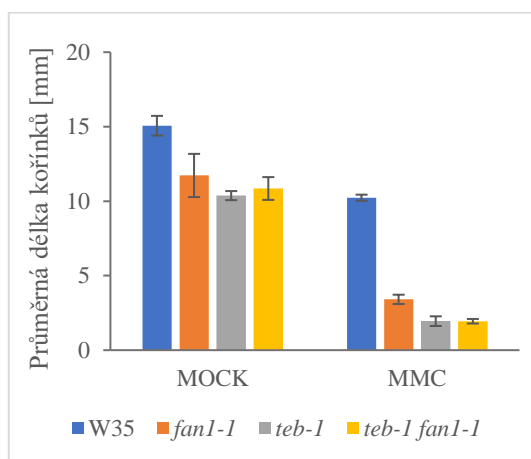
U linie *fan1-1* byla testována senzitivita na 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZEB, dále na 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ICRF-187, 20 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CPT, 50 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BLEO a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC. Vůči činidlům způsobujícím DNA-proteinové komplexy (ZEB, ICRF-187, CPT) byla linie rezistentní, naopak zvýšená senzitivita se jevila po indukci BLEO. Hypersenzitivita *fan1-1* byla zaznamenána pouze na MMC. Z mých výsledků plyne, že FAN1 není primárně zapojena do reparace DNA-proteinových komplexů, ale účastní se reparace interstrand crosslinků. Z toho důvodu byly všechny chemikálie kromě MMC z testování vyřazeny.

Na 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC v pevném 1/2 MS médiu byla testována i získaná mutantní linie *teb-1 fan1-1* ve 3 replikátech (stáří semenáčků 7 dní), nicméně tato koncentrace nebyla pro dvojitou mutantní linii ideální, jelikož fenotyp *teb-1 fan1-1* se nelišil od fenotypu jednoduché mutantní linie *teb-1*. Pro analýzu linie *teb-1 fan1-1* by bylo vhodné použít tekuté médium se 4 různými koncentracemi MMC (dle postupu Dorn et Puchta, 2020).



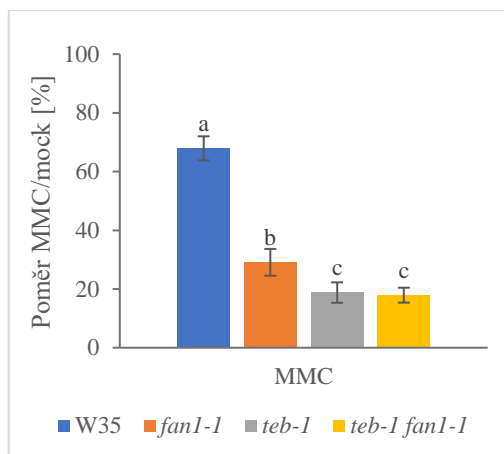
Obrázek 43: Testování senzitivity linií *fan1-1*, *teb-1* a dvojitě mutantní linie *teb-1 fan1-1* na MMC

Na obrázku jsou zobrazeny 7denní rostliny, jež byly vysazeny na kontrolní 1/2 MS médium (MOCK) a na 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC. Linie W35 slouží jako negativní kontrola. Měřítka představuje 1 cm.



Graf 5: Průměrné délky kořínků testovaných linií na 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC

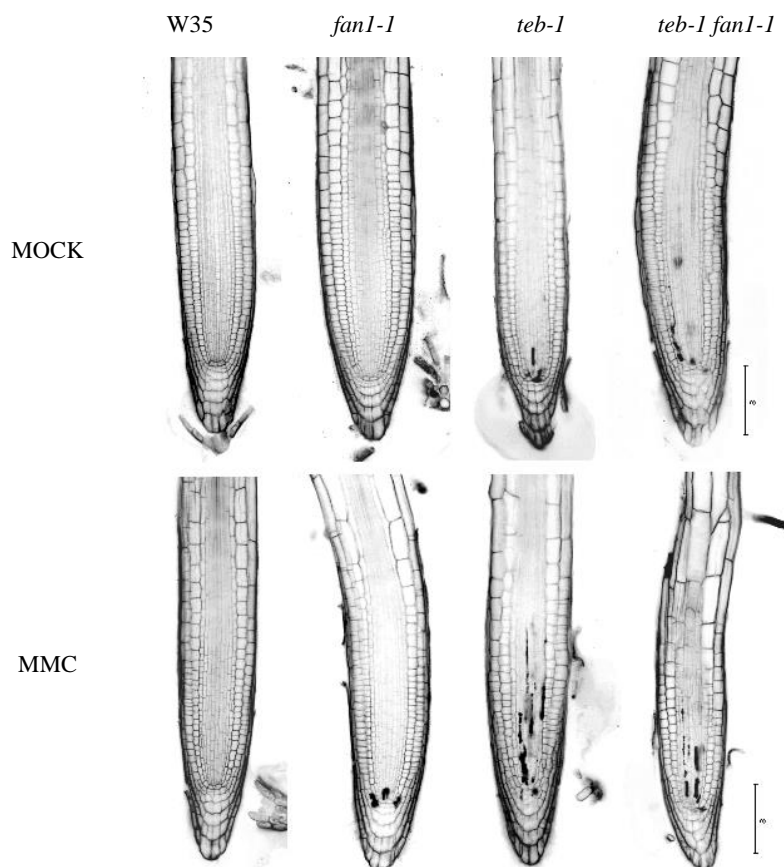
V grafu jsou zaznamenány průměrné délky [mm] kořínků 7denních testovaných rostlin na kontrolním 1/2 MS médiu (MOCK) a na 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC.



Graf 6: Poměr délek kořinek MMC/mock u testovaných linií

Zobrazeny jsou poměry délek kořinek testovaných linií na $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC vůči 1/2 MS médiu (MOCK). Hodnoty značené stejným písmenem nevykazují dle Tukeyho testu signifikantní odlišnost ($P \leq 0,05$).

Zároveň byla u linií *teb-1*, *fan1-1* a dvojitě mutantní linie *teb-1 fan1-1* po obarvení propidium jodidem analyzována buněčná smrt v kořenovém meristému po indukci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC (5 dní inkubace v 0,8% 1/2 MS a 24 hod inkubace v tekutém 1/2 MS bez chemikálie a s $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC).



Obrázek 44: Analýza buněčné smrti v kořenovém meristému u linie *teb-1 fan1-1*

Na obrázku jsou zobrazeny kořeny 6denních semenáčků linií W-35, *fan1-1*, *teb-1* a *teb-1 fan1-1*, které byly po dobu 5 dnů nejprve pěstovány na 0,8% 1/2 MS médiu a následně 12 hod inkubovány v tekutém 1/2 MS médiu bez chemikálie (MOCK) a s $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC. Poškozené buňky jsou v kořenech značeny tmavě. Měřítka na snímcích představuje $100 \mu\text{m}$.

Kořenový meristém linie W35 byl pravidelně uspořádan. Působením $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC nedošlo k poškození buněk, buněčná smrt nebyla zaznamenána. U linie *fan1-1* byly po indukci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC poškozeny buňky nacházející se v blízkosti QC. Často se jednalo právě o kmenové buňky, které fungují jako prekurzory diferencovaných buněk. U linie *teb-1* byla zaznamenána buněčná smrt již na kontrolním médiu (MOCK), po indukci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC byl pozorován její nárůst. Kořeny *teb-1* jsou charakteristické morfologickou deformací.

Při analýze apikálního kořenového meristému *teb-1 fan1-1* nebyl pozorován zhoršující fenotyp, než jaký byl zaznamenán u linie *teb-1*. Dvojitá mutantní linie vykazovala podobné morfologické defekty v kořenovém apikálním meristému, jaké se nacházely i u linie *teb-1*.

Vzhledem k tomu, že nebyl sledován aditivní účinek mutací dvou genů u linie *teb-1 fan1-1*, lze usuzovat, že nukleáza FAN1-1 může být zapojena ve stejné dráze jako TEB. FAN1-1 se patrně podílí na resekci DNA, kdy činností MRN komplexu a CtIP může odhalovat mikrohomologní sekvence, které jsou nutné pro opravu MMEJ. Ačkoliv podobný názor zastávají také ve studii Kais et al. (2016), zůstává molekulární mechanismus propojení FAN1 a MMEJ neobjasněn a vyžaduje ještě další analýzy pro jeho pochopení.

6 DISKUSE

Výzkum na Ústavu experimentální botaniky AV ČR pod vedením doc. Mgr. Aleše Pečinky, Ph.D. je zaměřen na analýzu genů, které se účastní oprav DNA-proteinových komplexů. Od samotného počátku experimentu nejsou známy zajímavé geny, jako je tomu v reverzní genetice. Naopak využíváme princip dopředné genetiky (Page et Grossniklaus, 2002). V EMS mutagenizované populaci huseníčku rolního identifikujeme zasažené geny selektivně díky senzitivě na metyltransferázový inhibitor zebularin, který je po začlenění do molekuly DNA schopen vytvářet DNA-proteinové komplexy s DNA-methyltransferázou 1.

Experimentální část navazovala na diplomovou práci M.Sc. Karin Kruska (Kruska, 2017) a mou bakalářskou práci (Jemelková, 2019). V rámci těchto prací byly vyselektovány kandidátní linie s mutací v genu *TEBICHI* (9B-43) a *SMC6B* (6-10, 9A-10, 9A-30, 9A-32). Jedna kandidátní *smc6b* linie (17A-26) byla nalezena také Mgr. Klárou Procházkovou.

SMC5/6 komplex má důležitou roli v opravě DNA-proteinových komplexů při replikaci DNA. SMC5/6 komplex je považován za zprostředkovatele homologní rekombinace závislé na syntéze DNA vlákna (SDSA, synthesis-dependent strand-annealing) (Mengiste, 1999; Hanin et al., 2000; Watanabe et al., 2009; Liu et al., 2015).



Obrázek 45: Pracovní model poškození způsobeného zebularinem a jeho repara

Zlomy DNA, DNA-proteinové komplexy, ale i interstrand crosslinky mohou být vyvolány v jakékoliv fázi buněčného cyklu. Zebularinem indukované poškození je specifické tím, že vzniká během replikace DNA v průběhu syntézy nových řetězců, v důsledku čehož dochází k pozastavení buněčného dělení, podpoře endoreduplikace a aktivaci signalizace poškození DNA aktivitou ATR a ATM. Oprava DNA-proteinových komplexů indukovaných zebularinem je závislá na aktivitě SMC5/6 komplexu a je prováděna primárně cestou SDSA, v menší míře také SSA homologní rekombinací (Liu et al., 2015).

Základ SMC5/6 komplexu tvoří SMC5 a SMC6 podjednotky, které dále interagují s nejméně šesti NSE (NON-SMC-ELEMENT) podjednotkami, jež vytváří odlišné subkomplexy: NSE2-SMC5-SMC6, NSE1-NSE3-NSE4 a NSE5-NSE6. Přestože SMC5/6 komplex má u různých organismů stejnou či podobnou stavbu, nomenklatura jeho podjednotek se liší a v některých případech jsou jednotlivé podjednotky kódovány dvěma paralogními geny (Diaz et Pecinka, 2018).

U huseníčku rolního byly identifikovány dvě SMC6 podjednotky – SMC6A a SMC6B. Linie *smc6b* se za standardních podmínek neliší od WT linie, avšak byla u ní prokázána hypersenzitivita vůči činidlům zapříčiňujícím poškození DNA. Zároveň je u této linie redukována frekvence homologní rekombinace (Mengiste, 1999; Watanabe et al., 2009; Liu et al., 2015). Linie *smc6a* je životaschopná, avšak kombinace *smc6b smc6a* se jeví jako letální, což poukazuje na částečnou funkční redundanci SMC6 podjednotek (Watanabe et al., 2009; Yan et al., 2013).

V rámci diplomové práce jsem měla za cíl popsat mutace v genu *SMC6B* kandidátních linií. U linie 6-10 byla potvrzena mutace G7362A, která se nacházela před exonem 28 v tzv. akceptorovém místě sestřihu (splice acceptor site), jenž udává spliceozomu hranici mezi intronem a exonem. Vlivem mutované báze nedokázal spliceozom rozpoznat začínající exon a 10 bp kódující sekvence deletoval. Původních 18 aminokyselin (pozice 1040–1058 AA primárního proteinu) bylo nahrazeno jinými aminokyselinami, z nichž jedna v pozici 1044 udává STOP kodon. Výsledný protein je tedy od své původní velikosti zkrácen o 14 aminokyselin. Walker B/ATPázová doména nebyla mutací zasazena. Analýza sekundární struktury proteinu SMC6B predikovala v oblasti 1048–1051 AA výskyt beta-skládaného listu. Tato aminokyselinová oblast byla u linie 6-10 vlivem mutace deletována a je tedy možné, že nepřítomnost této sekundární struktury může mít vliv na další skládání proteinu, funkčnost ATPázové domény, ale také na interakci SMC6B s jinými proteiny. Linie 6-10 je doposud jedinou popsanou *smc6b* linií, která nebyla získána T-DNA mutagenézí.

U linií 9A-10, 9A-30, 9A-32 a 17A-26 byla pomocí inverzní PCR detekována chromozomová přestavba, která zasahovala právě do genu *SMC6B*. Ačkoliv alkylační činidlo EMS způsobuje převážně tranzice bází, mohlo v genomu dojít na několika místech k jejich nahromadění. Tyto změny dále vedly k zablokování replikačního aparátu a vytvoření DSBs. Chromozomová přestavba je následkem nesprávného spojení vzniklých DSBs. Charakter této chromozomové přestavby nebyl dále zkoumán. Linie s chromozomovou přestavbou jsou pro výzkum nevhodné a z toho důvodu nebudou do dalších studií zahrnuty.

Studiem SMC5/6 komplexu a jeho NSE podjednotek se výzkumná skupina doc. Mgr. Aleše Pečinky Ph.D. zabývá od samotného počátku a potvrdila jeho zapojení do reparace DNA-proteinových komplexů (Liu et al., 2015; Díaz et al., 2019; Procházková, Finke, Pečinka et al, nepublikováno). Komplementační křížení, test senzitivity na zebularin a potvrzené mutace u zmíněných linií jsou pouze minimálním přínosem do komplexního výzkumu.

Nově identifikovaným genem, jenž se zapojuje do oprav DNA-proteinových komplexů, je *TEBICHI* kódující polymerázu s helikázovou aktivitou. Homologem TEB je u mnohobuněčných eukaryontních organismů POLQ/POLθ. Již z dřívějších výzkumů bylo zjištěno, že se tyto polymerázy zapojují do oprav dvouvláknových zlomů reparační dráhou známou také jako mikrohomologní spojování konců (MMEJ) (Decottignies, 2013; Deriano et Roth, 2013; Truong et al., 2013; Wang et al., 2019). Kromě toho zastávají také důležitou funkci při integraci T-DNA

do genomu (Kregten et al., 2016). Úloha TEB je rovněž spjata s regulací buněčného dělení a diferenciací meristému, stejně tak je nezbytná při replikaci a nese zodpovědnost za správnou expresi genů během vývoje (Inagaki et al., 2006, 2009).

Rostlinní mutanti *teb* vykazují morfologické defekty, pokud je zasažena jejich N-terminální helikázová doména (Inagaki et al., 2006). Toto tvrzení koresponduje i s mými výsledky. Mutací genu *TEB* (G2565A) u linie 9B-43 vzniká proteinový produkt bez této helikázové domény. Fenotypy linií *teb-1* (Inagaki et al., 2006) a 9B-43 byly shodné.

Mutantní linie *teb* (*Arabidopsis thaliana*, *Physcomitrella patens*) byly ve dvou studiích testovány na chemikáliích vyvolávajících různá poškození. Analyzovala se senzitivita vůči MMC, MMS, BLEO a cisplatině (Inagaki et al., 2006; Mara et al., 2019). Výsledky sensitivity *teb* linií se u obou skupin liší. Mara et al. (2019) uvádí, že mutantní linie *Physcomitrella patens* vykazují stejnou senzitivitu na MMS a cisplatinu jako WT linie a na BLEO jsou v porovnání s WT linií rezistentnější. Inagaki et al. (2006) testovali na chemikáliích mutantní linie huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) *teb-3* (s mutací v polymerázové doméně) a *teb-1* (s mutací v helikázové doméně). Linie *teb-1* vykazovala vyšší senzitivitu na MMC i MMS v porovnání s linií *teb-3* či WT. Senzitivita linií je patrně ovlivněna i lokalizací dané mutace.

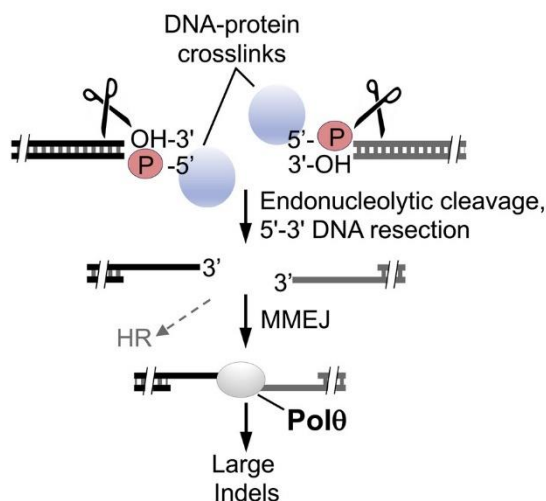
V rámci diplomové práce jsem analyzovala senzitivitu linií huseníčku rolního *teb-1* a 9B-43 na 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ZEB, 20 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ CPT, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ICRF-187, 50 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BLEO a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC. Na všech testovaných chemikáliích vykazovaly tyto linie vyšší úroveň sensitivity v porovnání s WT linií. Z výsledků vyplývá, že MMEJ není pouze vedlejší reparační dráhou, ale aktivně se zapojuje do reparace různých poškození (DNA-proteinových komplexů, interstrand crosslinků, jednovláknových a dvouvláknových zlomů).

Studie Beagan et al. (2017) provedená na *Drosophila melanogaster*, ale také výzkum Muzzini et al. (2008) na *Caenorhabditis elegans* potvrzují zapojení POL θ do oprav interstrand crosslinků (Muzzini et al., 2008; Beagan et al., 2017).

Zapojení TEB/POLQ/POL θ do oprav DNA-proteinových komplexů v dráze MMEJ potvrzuje také nedávno publikovaná studie Chandramouly et al. (2021), která byla prováděna na vaječných extraktech *Xenopus laevis*. Počáteční fáze reparace MMEJ pravděpodobně vyžaduje účast PARP1, která usnadňuje nábor esenciální POL θ do místa poškození (Ceccaldi et al., 2015; Mateos-Gomez et al., 2017). MRE11 a CtIP iniciují proces resekce vedoucí k tvorbě 3' ssDNA přesahů. POL θ usnadňuje synapsi 3' ssDNA konců pomocí mikrohomologních sekvencí a následně prodlužuje každý přesah (Black et al., 2016). V konečné fázi se na spojení vláken podílí LIG3 nebo LIG1 (Liang et al., 2008; Sfeir et Symington, 2015; Lu et al., 2016).

MRE11 je součástí konzervovaného komplexu MRN (Stingele et al., 2017). Kromě MRE11 se komplex MRN skládá z rekombinázy RAD50 a signálního transdukčního proteinu NBS1 (Williams et al., 2007). MRN a CtIP zahajují 5'-3' resekci DNA během S a G2 fáze, jež je nutná mimo MMEJ také pro HR. Nukleázová aktivita MRE11 a CtIP zajišťuje rezistenci vůči

CPT a etoposidu, které vytváří DNA proteinové komplexy s TOP1 a TOP2 (Stingele et al., 2017). HR a MMEJ využívají při opravě DNA-proteinových komplexů patrně stejný typ resekcce vytvořený pomocí endonukleázového komplexu MRN a CtIP, které na vlákně DNA vytvářejí DSB (Truong et al., 2013). Je možné, že se podobný mechanismus reparace DPCs dráhou MMEJ nachází také u rostlin, avšak toto tvrzení bude nutné ověřit.



Obrázek 46: Reparační dráha MMEJ DNA-proteinových komplexů

Homologní rekombinace (HR) a mikrohomologní spojování konců (MMEJ) využívají při opravě DNA-proteinových komplexů patrně stejný typ resekcce, který je vytvářen MRN a CtIP. Působením MRN a CtIP dochází k indukci DSBs, který pak může být opraven MMEJ či HR (Chandramouly et al., 2021).

V rámci mého výzkumu jsem vyseletovala dvojistou mutantní homozygotní linii *teb-1 fan1-1*. *FANCD1* (Fanconi anemia complementation group) geny jsou zapojeny v opravách interstrand crosslinků reparační dráhou FA (Fanconi anemia pathway). U savců bylo identifikováno celkem 22 *FANCD1* genů (*FANCA/ B/ C/ D1/ D2/ E/ F/ G/ I/ J/ L/ M/ N/ O/ P/ Q/ R/ S/ T/ U/ V*) (Ceccaldi et al., 2016; Mamrak et al., 2017; Nepal et al., 2017; Maung et al., 2018). Mutace v těchto genech vyvolává vzácné autozomální onemocnění známé jako Fanconiho anémie, které způsobuje selhání kostní dřeně a zapříčiňuje chromozomové zlomy. Lidé s Fanconiho anémií se potýkají s vrozenými fyzickými malformacemi (Bogliolo et Surrallés, 2015; Nepal et al., 2017).

U rostlin byla identifikována přibližně polovina z 22 savčích *FANCD1* genů – *FANCD1 (BRCA2)/ D2/ E/ I/ J (BRIP1)/ L/ M/ O (RAD51C)/ Q (ERCC4)/ R/ T* (Dong et al., 2015). Do opravy interstrand crosslinků jsou zapojeny dva *FANCD1* geny (*FANCD1* a *FANCD2*) (Knoll et al., 2012; Dorn et al., 2019).

U huseníčku rolního byl objeven homolog *FANCD1* pojmenovaný jako *FANCD1* (Fanconi/FANCD2 associated nuclease 1). Herrmann et al. (2015) uvádí, že linie *fan1* je hypersenzitivní vůči MMC, z čehož plyne její zapojení do reparace interstrand crosslinků. Toto

tvrzení koresponduje i s mými daty. Dle dostupných informací je nukleáza FAN1 zapojena do reparace interstrand crosslinků, které mohou být opravovány jak somatickou, tak i meiotickou homologní rekombinací. Nicméně role FAN1 je v této dráze spíše vedlejší (Herrmann et al., 2015; Kurzbauer et al., 2018).

Pro zjištění míry poškození či buněčné smrti v apikálním kořenovém meristému bylo využito interkalační barvivo propidium jodid. U linie *fan1-1* byly po indukci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC poškozeny buňky nacházející se v blízkosti QC. Často se jednalo právě o kmenové buňky, které fungují jako prekurzory diferencovaných buněk. U linie *teb-1* byla zaznamenána buněčná smrt již na kontrolním médiu a po indukci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC došlo k jejímu rapidnímu navýšení. U dvojitě mutantní linie *teb-1 fan1-1* nebyl sledován aditivní účinek vlivem dvou vyskytujících se mutací. Na kontrolním médiu vykazovaly kořeny *teb-1 fan1-1* morfologické deformace, jako tomu bylo u linie *teb-1*. Po působení $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MMC došlo k nárůstu buněčné smrti, avšak míra zasažených buněk byla srovnatelná s linií *teb-1*. Výsledky naznačují, že nukleáza FAN1 může být zapojena do dráhy MMEJ.

Podobný závěr byl vyřčen také ve studii Kais et al. (2016). Dále bylo potvrzeno, že FAN1 je schopna do míst poškození přitáhnout CtIP (Murina et al., 2014), jenž je spojován s MRN komplexem (viz výše) (Liu et Huang, 2016). Zářezy vytvořené MRE11 jsou zpracovávány ve směru $3' \rightarrow 5'$ exonukleázovou aktivitou MRN celistvého komplexu, čímž dochází k odhalení sekvenčních mikrohomologií (MH) (Takeda et al., 2007; Nicolette et al., 2010; Truong et al., 2013; Seol et al., 2018). Zářez je také zpracováván ve směru $5' \rightarrow 3'$ exonukleázovou aktivitou exonukleázy 1 (EXO1) (Decottignies, 2007). Nicméně tato exonukleáza není schopná vypořádat se s interstrand crosslinky a je možné, že tuto roli zaujímá FAN1 (Pizzolato et al., 2015). Pizzolato et al. (2015) tvrdí, že se na resekci DNA účastní společně s MUS81, avšak toto tvrzení bylo vyvráceno ve studii Dorn et al. (2019), kde prokázali, že ačkoliv se reparace DNA crosslinků účastní také MUS81, děje se tak ve zcela nezávislých dráhách (Dorn et al., 2019).

Na základě získaných informací z literárních zdrojů a výsledků mé analýzy se domnívám, že nukleáza FAN1 není zapojena do reparace DNA-proteinových komplexů, ale účastní se oprav DNA interstrand crosslinků DNA. Díky interakci s CtIP a MRN komplexem může iniciovat opravu dvěma typy cest – HR a MMEJ.

7 ZÁVĚR

Výsledky získané v rámci mé diplomové práce, jež byla zpracována pod vedením doc. Mgr. Aleše Pečinky, Ph.D., přispěly ke komplexnímu výzkumu, který se zabývá identifikací a analýzou genů podílejících se na opravách DNA-proteinových komplexů u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Výzkum využívá strategii dopředného genetického screenu, tudíž je postaven na náhodné mutagenезi populace huseníčku rolního alkylačním činidlem ethylmetan sulfonátem a následné identifikaci zasažených genů. Pro selekci senzitivních rostlin je využíván cytidinový analog zebularin, jenž je schopen kovalentně vázat DNA-metyltransferázu 1, přičemž indukuje vznik DNA-proteinových crosslinků.

Výzkum diplomové práce navazuje na mou bakalářskou práci (Jemelková, 2019), v níž byly identifikovány tři linie s mutací v genu *SMC6B* (9A-10, 9A-30 a 9A-32). V rámci bakalářské práce byla zároveň vyselektována linie 9B-43 s pravděpodobnou mutací v genu *TEBICHI*. Dále byly pro výzkum využity další linie s mutací v genu *SMC6B* získané M.Sc. Karin Kruska (linie 6-10) a Mgr. Klárou Procházkovou (linie 17A-26).

Zasažené geny byly identifikovány pomocí komplementačního křížení a mutace se u vybraných linií potvrzovala sekvenováním. U linie 6-10 byla potvrzena mutace G7362A v genu *SMC6B*, která se nacházela před exonem 28 v tzv. akceptorovém místě sestřihu (splice acceptor site), jenž udává spliceozomu hranici mezi intronem a exonem. Vlivem mutované báze nedokázal spliceozom rozpoznat začínající exon a 10 bp kódující sekvence deletoval. Původních 18 aminokyselin (pozice 1040–1058 AA primárního proteinu) bylo nahrazeno jinými aminokyselinami, z nichž jedna v pozici 1044 udává STOP kodon. Výsledný protein je tedy od své původní velikosti zkrácen o 14 aminokyselin. Walker B/ATPázová doména nebyla mutací zasažena. Analýza sekundární struktury proteinu *SMC6B* predikovala v oblasti 1048–1051 AA výskyt beta-skládaného listu. Tato aminokyselinová oblast byla u linie 6-10 vlivem mutace deletována a je tedy možné, že nepřítomnost této sekundární struktury může mít vliv na další skládání proteinu, funkčnost ATPázové domény, ale také na interakci *SMC6B* s jinými proteiny. Linie 6-10 je doposud jedinou popsanou *smc6b* linií, která nebyla získána T-DNA mutagenézí.

U linií 9A-10, 9A-30, 9A-32 a 17A-26 byla detekována pomocí inverzní PCR chromozomová přestavba, která zasahovala právě do genu *SMC6B*, čímž narušila jeho funkčnost. Linie s chromozomovou přestavbou jsou pro výzkum nevhodné, a z toho důvodu nebudou do další studie zahrnuty.

Analýza senzitivity vůči zebularinu potvrdila, že *SMC6B*, potažmo i celý *SMC5/6* komplex, jsou zapojeny do reparace DNA-proteinových komplexů.

Nově identifikovaným genem, jenž se zapojuje do oprav DNA-proteinových komplexů, je *TEBICHI* kódující polymerázu s helikázovou aktivitou. TEB je aktérem reparační dráhy využívající mikrohomologní sekvence, která je známá pod názvem mikrohomologní spojování

konců (MMEJ). U linie 9B-43 byla identifikována záměna bází G2565A v genu *TEB*. Původní aminokyselina tryptofan v primární struktuře proteinu (v pozici 518 AA) byla nahrazena za předčasný STOP kodon. Při transkripci mutovaného genu a následné translaci vzniká nefunkční produkt *TEB* s deficiencí helikázové i polymerázové domény.

Mutantní linie s nefunkční helikázovou doménou vykazují senzitivitu vůči chemikáliím, které indukují vznik DNA-proteinových komplexů (ZEB, CPT i ICRF-187), dvouvláknové zlomy (BLEO), ale také interstrand crosslinky (MMC). Po indukci daných chemikálií došlo v apikálních kořenových meristémech mutantních linií k nárůstu buněčné smrti. Tyto analýzy potvrdily zapojení *TEB* do reparace různých typů poškození.

Mechanismus reparace jednotlivých poškození dráhou MMEJ zůstává doposud neznámý. Analýzy dvojitých mutantních linií nám ve výzkumu umožňují pochopit roli a zapojení jednotlivých komponent do reparace různých typů poškození, primárně tedy DNA-proteinových komplexů. Selektce a analýza dvojitě mutantní linie *teb-1 fan1-1* potvrdila zapojení FAN1 a *TEB* do stejné reparační dráhy opravující interstrand crosslinky. Na základě výsledků mé analýzy se domnívám, že se FAN1 nepodílí na reparaci DNA-proteinových komplexů. Objasnění dalších vztahů je předmětem budoucího výzkumu.

8 LITERATURA

Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* *15*, 2177–2196.

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

Ahmad, A., Robinson, A.R., Duensing, A., van Drunen, E., Beverloo, H.B., Weisberg, D.B., Hasty, P., Hoeijmakers, J.H.J., Niedernhofer, L.J. (2008). ERCC1-XPF Endonuclease Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. *MCB* *28*, 5082–5092.

Alabert, C., Groth, A. (2012). Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 153–167.

Alonso, J.M. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* *301*, 653–657.

Amiard, S., Depeiges, A., Allain, E., White, C.I., Gallego, M.E. (2011). Arabidopsis ATM and ATR Kinases Prevent Propagation of Genome Damage Caused by Telomere Dysfunction. *Plant Cell* *23*, 4254–4265.

Ampatzidou, E., Irmisch, A., O’Connell, M.J., Murray, J.M. (2006). Smc5/6 Is Required for Repair at Collapsed Replication Forks. *Molecular and Cellular Biology* *26*, 9387–9401.

Andrews, E.A., Palecek, 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.

Arana, M.E., Seki, M., Wood, R.D., Rogozin, I.B., Kunkel, T.A. (2008). Low-fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase theta. *Nucleic Acids Research* *36*, 3847–3856.

Attikum, H. van, Bundock, P., Hooykaas, P.J.J. (2001). Non-homologous end-joining proteins are required for Agrobacterium T-DNA integration. *The EMBO Journal* *20*, 6550.

Barker, P.A., Salehi, A. (2002). The MAGE proteins: Emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J. Neurosci. Res.* *67*, 705–712.

Baubec, T., Pecinka, A., Rozhon, W., Mittelsten Scheid, O. (2009). Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine. *The Plant Journal* *57*, 542–554.

Baylin, S.B., Herman, J.G. (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics* 16, 168–174.

Beagan, K., Armstrong, R.L., Witsell, A., Roy, U., Renedo, N., Baker, A.E., Schärer, O.D., McVey, M. (2017). *Drosophila* DNA polymerase theta utilizes both helicase-like and polymerase domains during microhomology-mediated end joining and interstrand crosslink repair. *PLoS Genet* 13, e1006813.

Beisler, J.A. (1978). Isolation, characterization, and properties of a labile hydrolysis product of the antitumor nucleoside, 5-azacytidine. *J. Med. Chem.* 21, 204–208.

Bermudez-Lopez, M., Ceschia, A., de Piccoli, G., Colomina, N., Pasero, P., Aragon, L., Torres-Rosell, J. (2010). The Smc5/6 complex is required for dissolution of DNA-mediated sister chromatid linkages. *Nucleic Acids Research* 38, 6502–6512.

Betts Lindroos, H., Ström, L., Itoh, T., Katou, Y., Shirahige, K., Sjögren, C. (2006). Chromosomal Association of the Smc5/6 Complex Reveals that It Functions in Differently Regulated Pathways. *Molecular Cell* 22, 755–767.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.

Black, S., Kashkina, E., Kent, T., Pomerantz, R. (2016). DNA Polymerase θ : A Unique Multifunctional End-Joining Machine. *Genes* 7, 67.

Bogliolo, M., Surrallés, J. (2015). Fanconi anemia: a model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics. *Current Opinion in Genetics & Development* 33, 32–40.

Bozděchová, L. (2016). MAGE (Melanoma-associated antigen) proteiny: Kofaktory buněčných procesů. *Disertační práce. Masarykova Univerzita.*

Brettel, K., Byrdin, M. (2010). Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Current Opinion in Structural Biology* 20, 693–701.

Britt, A.B., Chen, J.J., Wykoff, D., Mitchell, D. (1993). A UV-sensitive mutant of *Arabidopsis* defective in the repair of pyrimidine-pyrimidinone(6-4) dimers. *Science* 261, 1571–1574.

Carter, S.D., Sjögren, C. (2012). The SMC complexes, DNA and chromosome topology: right or knot? *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 47, 1–16.

Ceccaldi, R., Liu, J.C., Amunugama, R., Hajdu, I., Primack, B., Petalcorin, M.I.R., O'Connor, K.W., Konstantinopoulos, P.A., Elledge, S.J., Boulton, S.J., et al. (2015). Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol θ -mediated repair. *Nature* 518, 258–262.

Ceccaldi, R., Sarangi, P., D'Andrea, A.D. (2016). The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 337–349.

Champion, C., Guianvarc'h, D., Sénamaud-Beaufort, C., Jurkowska, R.Z., Jeltsch, A., Ponger, L., Arimondo, P.B., Guieysse-Peugeot, A.-L. (2010). Mechanistic Insights on the Inhibition of C5 DNA Methyltransferases by Zebularine. *PLoS ONE* 5, e12388.

Chandramouly, G., Liao, S., Rusanov, T., Borisonnik, N., Calbert, M.L., Kent, T., Sullivan-Reed, K., Vekariya, U., Kashkina, E., Skorski, T., et al. (2021). Polθ promotes the repair of 5'-DNA-protein crosslinks by microhomology-mediated end-joining. *Cell Reports* 34, 108820.

Chavez, A., George, V., Agrawal, V., Johnson, F.B. (2010). Sumoylation and the Structural Maintenance of Chromosomes (Smc) 5/6 Complex Slow Senescence through Recombination Intermediate Resolution. *J. Biol. Chem.* 285, 11922–11930.

Chen, L., Trujillo, K.M., Van Komen, S., Roh, D.H., Krejci, L., Lewis, L.K., Resnick, M.A., Sung, P., Tomkinson, A.E. (2005). Effect of Amino Acid Substitutions in the Rad50 ATP Binding Domain on DNA Double Strand Break Repair in Yeast. *J. Biol. Chem.* 280, 2620–2627.

Cheng, J.C., Matsen, C.B., Gonzales, F.A., Ye, W., Greer, S., Marquez, V.E., Jones, P.A., Selker, E.U. (2003). Inhibition of DNA Methylation and Reactivation of Silenced Genes by Zebularine. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 95, 399–409.

Cimprich, K.A., Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 616–627.

Clark, D.P., Pazdernik, N.J., McGehee, M.R. (2019). Polymerase Chain Reaction. In *Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 168–198.

Constantinides, P.G., Jones, P.A., Gevers, W. (1977). Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* 267, 364–366.

Culligan, K.M., Robertson, C.E., Foreman, J., Doerner, P., Britt, A.B. (2006). ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *The Plant Journal* 48, 947–961.

De Piccoli, G., Cortes-Ledesma, F., Ira, G., Torres-Rosell, J., Uhle, S., Farmer, S., Hwang, J.-Y., Machin, F., Ceschia, A., McAleenan, A., et al. (2006). Smc5–Smc6 mediate DNA double-strand-break repair by promoting sister-chromatid recombination. *Nat Cell Biol* 8, 1032–1034.

De Schutter, K., Joubès, J., Cools, T., Verkest, A., Corellou, F., Babychuk, E., Van Der Schueren, E., Beekman, T., Kushnir, S., Inzé, D., et al. (2007). Arabidopsis WEE1 Kinase Controls Cell Cycle Arrest in Response to Activation of the DNA Integrity Checkpoint. *Plant Cell* 19, 211–225.

- Decottignies, A. (2007). Microhomology-Mediated End Joining in Fission Yeast Is Repressed by Pku70 and Relies on Genes Involved in Homologous Recombination. *Genetics* 176, 1403–1415.
- Decottignies, A. (2013). Alternative end-joining mechanisms: a historical perspective. *Front. Genet.* 4.
- Deriano, L., Roth, D.B. (2013). Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. *Annu. Rev. Genet.* 47, 433–455.
- Devos, K.M. (2002). Genome Size Reduction through Illegitimate Recombination Counteracts Genome Expansion in Arabidopsis. *Genome Research* 12, 1075–1079.
- Diaz, M.A. (2018). Functional characterization of NSE4 paralogs in Arabidopsis thaliana. Univerzita v Kolíně.
- Diaz, M., Pecinka, A. (2018). Scaffolding for Repair: Understanding Molecular Functions of the SMC5/6 Complex. *Genes* 9, 36.
- Díaz, M., Pečinková, P., Nowicka, A., Baroux, C., Sakamoto, T., Gandha, P.Y., Jeřábková, H., Matsunaga, S., Grossniklaus, U., Pecinka, A. (2019). The SMC5/6 Complex Subunit NSE4A Is Involved in DNA Damage Repair and Seed Development. *Plant Cell* 31, 1579–1597.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development (Cambridge, England)* 119.
- Dong, H., Nebert, D.W., Bruford, E.A., Thompson, D.C., Joenje, H., Vasiliou, V. (2015). Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Human Genomics* 9.
- Dorn, A., Puchta, H. (2020). Analyzing Somatic DNA Repair in Arabidopsis Meiotic Mutants. In *Plant Meiosis*, M. Pradillo, and S. Heckmann, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 359–366.
- Dorn, A., Feller, L., Castri, D., Röhrig, S., Enderle, J., Herrmann, N.J., Block-Schmidt, A., Trapp, O., Köhler, L., Puchta, H. (2019). An Arabidopsis FANCI helicase homologue is required for DNA crosslink repair and rDNA repeat stability. *PLoS Genetics* 15.
- Dote, H. (2005). Enhancement of In vitro and In vivo Tumor Cell Radiosensitivity by the DNA Methylation Inhibitor Zebularine. *Clinical Cancer Research* 11, 4571–4579.
- Doyle, J.M., Gao, J., Wang, J., Yang, M., Potts, P.R. (2010). MAGE-RING Protein Complexes Comprise a Family of E3 Ubiquitin Ligases. *Molecular Cell* 39, 963–974.
- Duan, X., Yang, Y., Chen, Y.-H., Arenz, J., Rangi, G.K., Zhao, X., Ye, H. (2009). Architecture of the Smc5/6 Complex of Saccharomyces cerevisiae Reveals a Unique Interaction

between the Nse5-6 Subcomplex and the Hinge Regions of Smc5 and Smc6. *J. Biol. Chem.* *284*, 8507–8515.

Dubest, S., Gallego, M.E., White, C.I. (2002). Role of the AtRad1p endonuclease in homologous recombination in plants. *EMBO Reports* *3*, 1049.

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

Enderle, J., Dorn, A., Puchta, H. (2019a). DNA- and DNA-Protein-Crosslink Repair in Plants. *IJMS* *20*, 4304.

Enderle, J., Dorn, A., Beying, N., Trapp, O., Puchta, H. (2019b). The Protease WSS1A, the Endonuclease MUS81, and the Phosphodiesterase TDP1 Are Involved in Independent Pathways of DNA-protein Crosslink Repair in Plants. *Plant Cell* *31*, 775–790.

Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J., González Barón, M. (2003). Classification of anticancer drugs—a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treatment Reviews* *29*, 515–523.

Farcas, A.-M., Uluocak, P., Helmhart, W., Nasmyth, K. (2011). Cohesin's Concatenation of Sister DNAs Maintains Their Intertwining. *Molecular Cell* *44*, 97–107.

Feng, S., Jacobsen, S.E., Reik, W. (2010). Epigenetic Reprogramming in Plant and Animal Development. *Science* *330*, 622–627.

Fousteri, M.I. (2000). A novel SMC protein complex in *Schizosaccharomyces pombe* contains the Rad18 DNA repair protein. *The EMBO Journal* *19*, 1691–1702.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (1995). *DNA Repair and Mutagenesis* (ASM Press).

Fu, D., Calvo, J.A., Samson, L.D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer* *12*, 104–120.

Fujioka, Y., Kimata, Y., Nomaguchi, K., Watanabe, K., Kohno, K. (2002). Identification of a novel non-structural maintenance of chromosomes (SMC) component of the SMC5-SMC6 complex involved in DNA repair. *J. Biol. Chem.* *277*, 21585–21591.

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

Gaillard, P.-H.L., Wood, R.D. (2001). Activity of individual ERCC1 and XPF subunits in DNA nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Research* *29*, 872.

Gallego-Paez, L.M., Tanaka, H., Bando, M., Takahashi, M., Nozaki, N., Nakato, R., Shirahige, K., Hirota, T. (2014). Smc5/6-mediated regulation of replication progression contributes to chromosome assembly during mitosis in human cells. *MBoC* 25, 302–317.

Galvão, V.C., Nordström, K.J.V., Lanz, C., Sulz, P., Mathieu, J., Posé, D., Schmid, M., Weigel, D., Schneeberger, K. (2012). Synteny-based mapping-by-sequencing enabled by targeted enrichment: Synteny-based mapping-by-sequencing. *The Plant Journal* 1–10.

Ganji, M., Shaltiel, I.A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C.H., Dekker, C. (2018). Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science* 360, 102–105.

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. *Plant Cell* 15, 119–132.

de Graaf, B., Clore, A., McCullough, A.K. (2009). Cellular pathways for DNA repair and damage tolerance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks. *DNA Repair (Amst)* 8, 1207–1214.

Grossman, L., Caron, P.R., Mazur, S.J., Oh, E.Y. (1988). Repair of DNA-containing pyrimidine dimers. *The FASEB Journal* 2, 2696–2701.

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

Hanin, M., Mengiste, T., Bogucki, A., Paszkowski, J. (2000). Elevated levels of intrachromosomal homologous recombination in *Arabidopsis* overexpressing the MIM gene. *Plant J* 24, 183–189.

Herrmann, N.J., Knoll, A., Puchta, H. (2015). The nuclease FAN1 is involved in DNA crosslink repair in *Arabidopsis thaliana* independently of the nuclease MUS81. *Nucleic Acids Research* 43, 3653–3666.

Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., Liu, J. (2010). Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 44, 113–139.

Hirano, T. (2002). The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes & Development* 16, 399–414.

Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 311–322.

Hirano, T., Mitchison, T.J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* 79, 449–458.

Hirano, T., Kobayashi, R., Hirano, M. (1997). Condensins, Chromosome Condensation Protein Complexes Containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* Homolog of the *Drosophila* Barren Protein. *Cell* 89, 511–521.

Houser, S., Koshlatyi, S., Lu, T., Gopen, T., Bargonetti, J. (2001). Camptothecin and Zeocin Can Increase p53 Levels during All Cell Cycle Stages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 998–1009.

Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L.F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry* 260, 14873–14878.

Hu, Z., Cools, T., De Veylder, L. (2016). Mechanisms Used by Plants to Cope with DNA Damage. *Annual Review of Plant Biology* 67, 439–462.

Huang, Y., Li, L. (2013). DNA crosslinking damage and cancer - a tale of friend and foe. *Translational Cancer Research* 2, 144.

Huang, L., Yang, S., Zhang, S., Liu, M., Lai, J., Qi, Y., Shi, S., Wang, J., Wang, Y., Xie, Q., et al. (2009). The Arabidopsis SUMO E3 ligase AtMMS21, a homologue of NSE2/MMS21, regulates cell proliferation in the root. *The Plant Journal* 60, 666–678.

Hudson, J.J.R., Bednarova, K., Kozakova, L., Liao, C., Guerineau, M., Colnaghi, R., Vidot, S., Marek, J., Bathula, S.R., Lehmann, A.R., et al. (2011). Interactions between the Nse3 and Nse4 Components of the SMC5-6 Complex Identify Evolutionarily Conserved Interactions between MAGE and EID Families. *PLoS ONE* 6, e17270.

Ide, H., Nakano, T., Shoukamy, M.I., Salem, A.M.H. (2015). Formation, Repair, and Biological Effects of DNA–Protein Cross-Link Damage. *Advances in DNA Repair*.

Ide, H., Nakano, T., Salem, A.M.H., Shoukamy, M.I. (2018). DNA–protein cross-links: Formidable challenges to maintaining genome integrity. *DNA Repair* 71, 190–197.

Inagaki, S., Suzuki, T., Ohto, M., Urawa, H., Horiuchi, T., Nakamura, K., Morikami, A. (2006). Arabidopsis *TEBICHI*, with Helicase and DNA Polymerase Domains, Is Required for Regulated Cell Division and Differentiation in Meristems. *The Plant Cell* 18, 879.

Inagaki, S., Nakamura, K., Morikami, A. (2009). A Link among DNA Replication, Recombination, and Gene Expression Revealed by Genetic and Genomic Analysis of *TEBICHI* Gene of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 5, e1000613.

Interthal, H., Heyer, W.-D. (2000). MUS81 encodes a novel Helix-hairpin-Helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 263, 812–827.

Irmisch, A., Ampatzidou, E., Mizuno, K., O'Connell, M.J., Murray, J.M. (2009). Smc5/6 maintains stalled replication forks in a recombination-competent conformation. *The EMBO Journal* 28, 144–155.

Ishida, T., Fujiwara, S., Miura, K., Stacey, N., Yoshimura, M., Schneider, K., Adachi, S., Minamisawa, K., Umeda, M., Sugimoto, K. (2009). SUMO E3 Ligase HIGH PLOIDY2 Regulates Endocycle Onset and Meristem Maintenance in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 2284–2297.

Ivanov, V.B., Dubrovsky, J.G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science* 18, 237–243.

Jemelková, J. (2019), Analýza genů podílejících se na opravě toxických DNA-proteinových komplexů u huseníčku rolního. Univerzita Palackého

Jeppsson, K., Kanno, T., Shirahige, K., Sjögren, C. (2014). The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 601–614.

Jones, P.A., Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415–428.

Kais, Z., Rondinelli, B., Holmes, A., O'Leary, C., Kozono, D., D'Andrea, A.D., Ceccaldi, R. (2016). FANCD2 Maintains Fork Stability in BRCA1/2-Deficient Tumors and Promotes Alternative End-Joining DNA Repair. *Cell Reports* 15, 2488–2499.

Kamiya, H. (2004). Mutagenicities of 8-Hydroxyguanine and 2-Hydroxyadenine Produced by Reactive Oxygen Species. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 475–479.

Kanno, T., Berta, D.G., Sjögren, C. (2015). The Smc5/6 Complex Is an ATP-Dependent Intermolecular DNA Linker. *Cell Reports* 12, 1471–1482.

Kent, T., Chandramouly, G., McDevitt, S.M., Ozdemir, A.Y., Pomerantz, R.T. (2015). Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase θ . *Nat Struct Mol Biol* 22, 230–237.

Kim, Y., Schumaker, K.S., Zhu, J.-K. (2006). EMS Mutagenesis of Arabidopsis. In *Arabidopsis Protocols*, (New Jersey: Humana Press), pp. 101–104.

Klemm, T., Mannuß, A., Kobbe, D., Knoll, A., Trapp, O., Dorn, A., Puchta, H. (2017). The DNA translocase RAD5A acts independently of the other main DNA repair pathways, and requires both its ATPase and RING domain for activity in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 91, 725–740.

Knoll, A., Higgins, J.D., Seeliger, K., Reha, S.J., Dangel, N.J., Bauknecht, M., Schröpfer, S., Franklin, F.C.H., Puchta, H. (2012). The Fanconi Anemia Ortholog FANCM Ensures Ordered

Homologous Recombination in Both Somatic and Meiotic Cells in Arabidopsis. *The Plant Cell* 24, 1448.

Kregten, M. van, Pater, S. de, Romeijn, R., Schendel, R. van, Hooykaas, P.J.J., Tijsterman, M. (2016). T-DNA integration in plants results from polymerase- θ -mediated DNA repair. *Nature Plants* 2, 1–6.

Krokan, H.E., Bjørås, M. (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a012583.

Kruska, K. (2017). Forward genetic screen to identify genes involved in repair of zebularine-induced DNA damage. Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung.

Kurzbauer, M.-T., Pradillo, M., Kerzendorfer, C., Sims, J., Ladurner, R., Oliver, C., Janisiw, M.P., Mosiolek, M., Schweizer, D., Copenhaver, G.P., et al. (2018). Arabidopsis thaliana FANCD2 Promotes Meiotic Crossover Formation. *Plant Cell* 30, 415–428.

Kuwajima, T. (2006). Necdin Promotes GABAergic Neuron Differentiation in Cooperation with Dlx Homeodomain Proteins. *Journal of Neuroscience* 26, 5383–5392.

Leadon, S.A. (1996). Repair of DNA damage produced by ionizing radiation: A minireview. *Seminars in Radiation Oncology* 6, 295–305.

Li, G., Zou, W., Jian, L., Qian, J., Deng, Y., Zhao, J. (2017). Non-SMC elements 1 and 3 are required for early embryo and seedling development in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 68, 1039–1054.

Liang, L., Deng, L., Nguyen, S.C., Zhao, X., Maulion, C.D., Shao, C., Tischfield, J.A. (2008). Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* 36, 3297–3310.

Lim, S.P., Neilsen, P., Kumar, R., Abell, A., Callen, D.F. (2011). The Application of Delivery Systems for DNA Methyltransferase Inhibitors: *BioDrugs* 25, 227–242.

Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715.

Liu, T., Huang, J. (2016). DNA End Resection: Facts and Mechanisms. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 14, 126–130.

Liu, C.-H., Finke, A., Díaz, M., Rozhon, W., Poppenberger, B., Baubec, T., Pecinka, A. (2015). Repair of DNA Damage Induced by the Cytidine Analog Zebularine Requires ATR and ATM in Arabidopsis. *The Plant Cell* 27, 1788–1800.

Liu, M., Shi, S., Zhang, S., Xu, P., Lai, J., Liu, Y., Yuan, D., Wang, Y., Du, J., Yang, C. (2014). SUMO E3 ligase AtMMS21 is required for normal meiosis and gametophyte development in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* 14, 153.

Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R., Hirano, T. (2000). Identification and Characterization of Sa/Scp3p Subunits in the Xenopus and Human Cohesin Complexes. *Journal of Cell Biology* 150, 405–416.

Lu, G., Duan, J., Shu, S., Wang, X., Gao, L., Guo, J., Zhang, Y. (2016). Ligase I and ligase III mediate the DNA double-strand break ligation in alternative end-joining. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, 1256–1260.

Ma, J.-L., Kim, E.M., Haber, J.E., Lee, S.E. (2003). Yeast Mre11 and Rad1 Proteins Define a Ku-Independent Mechanism To Repair Double-Strand Breaks Lacking Overlapping End Sequences. *MCB* 23, 8820–8828.

Ma, Q., Akiyama, Y., Xu, Z., Konishi, K., Hecht, S.M. (2009). Identification and Cleavage Site Analysis of DNA Sequences Bound Strongly by Bleomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 2013–2022.

Mamrak, N.E., Shimamura, A., Howlett, N.G. (2017). Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. *Blood Reviews* 31, 93.

Mannuss, A., Dukowic-Schulze, S., Suer, S., Hartung, F., Pacher, M., Puchta, H. (2010). RAD5A, RECQ4A, and MUS81 Have Specific Functions in Homologous Recombination and Define Different Pathways of DNA Repair in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 22, 3318–3330.

Maple, J., Møller, S.G. (2007). Mutagenesis in Arabidopsis. In *Circadian Rhythms*, E. Rosato, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 197–206.

Mara, K., Charlot, F., Guyon-Debast, A., Schaefer, D.G., Collonnier, C., Grelon, M., Nogué, F. (2019). POLQ plays a key role in the repair of CRISPR/Cas9-induced double-stranded breaks in the moss Physcomitrella patens. *New Phytologist* 222, 1380–1391.

Mateos-Gomez, P.A., Kent, T., Kashkina, E., Pomerantz, R.T., Sfeir, A. (2017). The helicase domain of Polθ counteracts RPA to promote alt-NHEJ (Genetics).

Maung, K.Z.Y., Leo, P.J., Bassal, M., Casolari, D.A., Gray, J.X., Bray, S.C., Pederson, S., Singhal, D., Samaraweera, S.E., Nguyen, T., et al. (2018). Rare variants in Fanconi anemia genes are enriched in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal* 8.

McDonald, W.H., Pavlova, Y., Yates, J.R., Boddy, M.N. (2003). Novel Essential DNA Repair Proteins Nse1 and Nse2 Are Subunits of the Fission Yeast Smc5-Smc6 Complex. *J. Biol. Chem.* 278, 45460–45467.

McMahon, K.W., Karunasena, E., Ahuja, N. (2017). The Roles of DNA Methylation in the Stages of Cancer: *The Cancer Journal* 23, 257–261.

McVey, M., Lee, S.E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in Genetics* 24, 529–538.

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

Molinier, J., Ries, G., Bonhoeffler, S., Hohn, B. (2004). Interchromatid and Interhomolog Recombination in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 16, 342–352.

Murai, J., Huang, S.N., Das, B.B., Dexheimer, T.S., Takeda, S., Pommier, Y. (2012). Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (TDP1) Repairs DNA Damage Induced by Topoisomerases I and II and Base Alkylation in Vertebrate Cells. *J. Biol. Chem.* 287, 12848–12857.

Murina, O., von Aesch, C., Karakus, U., Ferretti, L.P., Bolck, H.A., Hänggi, K., Sartori, A.A. (2014). FANCD2 and CtIP Cooperate to Repair DNA Interstrand Crosslinks. *Cell Reports* 7, 1030–1038.

Muzzini, D.M., Plevani, P., Boulton, S.J., Cassata, G., Marini, F. (2008). Caenorhabditis elegans POLQ-1 and HEL-308 function in two distinct DNA interstrand cross-link repair pathways. *DNA Repair* 7, 941–950.

Naegeli, H. (1997). DNA Structure: Inherent instability and genotoxic reactions. In *Mechanisms of DNA Damage Recognition in Mammalian Cells*, (Singer), pp. 210, 49–50.

Nakano, T., Morishita, S., Katafuchi, A., Matsubara, M., Horikawa, Y., Terato, H., Salem, A.M.H., Izumi, S., Pack, S.P., Makino, K., et al. (2007). Nucleotide Excision Repair and Homologous Recombination Systems Commit Differentially to the Repair of DNA-Protein Crosslinks. *Molecular Cell* 28, 147–158.

Nakano, T., Xu, X., Salem, A.M.H., Shoukamy, M.I., Ide, H. (2017). Radiation-induced DNA-protein crosslinks: Mechanisms and biological significance. *Free Radical Biology and Medicine* 2017, 136–145.

Nasmyth, K., Haering, C.H. (2005). THE STRUCTURE AND FUNCTION OF SMC AND KLEISIN COMPLEXES. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 595–648.

Nepal, M., Che, R., Zhang, J., Ma, C., Fei, P. (2017). Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends in Cancer* 3, 840–856.

Nicolette, M.L., Lee, K., Guo, Z., Rani, M., Chow, J.M., Lee, S.E., Paull, T.T. (2010). Mre11–Rad50–Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1478–1485.

Orta, M.L., Calderón-Montaña, J.M., Domínguez, I., Pastor, N., Burgos-Morón, E., López-Lázaro, M., Cortés, F., Mateos, S., Helleday, T. (2013). 5-Aza-2'-deoxycytidine causes replication lesions that require Fanconi anemia-dependent homologous recombination for repair. *Nucleic Acids Research* 41, 5827–5836.

Page, D.R., Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* 3, 124–136.

Palecek, J. (2018). SMC5/6: Multifunctional Player in Replication. *Genes* 10, 7.

Palecek, J.J., Gruber, S. (2015). Kite Proteins: a Superfamily of SMC/Kleisin Partners Conserved Across Bacteria, Archaea, and Eukaryotes. *Structure* 23, 2183–2190.

Palecek, J., Vidot, S., Feng, M., Doherty, A.J., Lehmann, A.R. (2006). The Smc5-Smc6 DNA Repair Complex: BRIDGING OF THE Smc5-Smc6 HEADS BY THE KLEISIN, Nse4, AND NON-KLEISIN SUBUNITS. *Journal of Biological Chemistry* 281, 36952–36959.

Pebernard, S., Perry, J.J.P., Tainer, J.A., Boddy, M.N. (2008). Nse1 RING-like Domain Supports Functions of the Smc5-Smc6 Holocomplex in Genome Stability. *MBoC* 19, 4099–4109.

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

Pecinka, A., Rosa, M., Schikora, A., Berlinger, M., Hirt, H., Luschnig, C., Scheid, O.M. (2009). Transgenerational Stress Memory Is Not a General Response in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 4, e5202.

Peng, X.P., Lim, S., Li, S., Marjavaara, L., Chabes, A., Zhao, X. (2018). Acute Smc5/6 depletion reveals its primary role in rDNA replication by restraining recombination at fork pausing sites. *PLoS Genet* 14, e1007129.

Piccoli, G.D., Torres-Rosell, J., Aragón, L. (2009). The unnamed complex: what do we know about Smc5-Smc6? *Chromosome Res* 17, 251–263.

Pizzolato, J., Mukherjee, S., Schärer, O.D., Jiricny, J. (2015). FANCD2-associated Nuclease 1, but Not Exonuclease 1 or Flap Endonuclease 1, Is Able to Unhook DNA Interstrand Cross-links in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 290, 22602.

Plo, I. (2003). Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA Repair* 2, 1087–1100.

Pommier, Y. (2009). DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology, and Interfacial Inhibition. *Chem. Rev.* *109*, 2894–2902.

Pommier, Y., Marchand, C. (2012). Erratum: Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes. *Nat Rev Drug Discov* *11*, 250–250.

Pommier, Y., Barcelo, J.M., Rao, V.A., Sordet, O., Jobson, A.G., Thibaut, L., Miao, Z., Seiler, J.A., Zhang, H., Marchand, C., et al. (2006). Repair of Topoisomerase I-Mediated DNA Damage. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 179–229.

Potts, P.R., Porteus, M.H., Yu, H. (2006). Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *EMBO J* *25*, 3377–3388.

Pouliot, J.J., Yao, K.C., Robertson, C.A., Nash, H.A. (1999). Yeast Gene for a Tyr-DNA Phosphodiesterase that Repairs Topoisomerase I Complexes. *Science* *286*, 552–555.

Povirk, L.F. (1996). DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* *355*, 71–89.

Prasad, R., Horton, J.K., Dai, D.-P., Wilson, S.H. (2019). Repair pathway for PARP-1 DNA-protein crosslinks. *DNA Repair* *73*, 71–77.

Puchta, H. (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot* *56*, 1–14.

Puchta, H., Swoboda, P., Hohn, B. (1995). Induction of intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *Plant J* *7*, 203–210.

Quiñones, J.L., Thapar, U., Yu, K., Fang, Q., Sobol, R.W., Demple, B. (2015). Enzyme mechanism-based, oxidative DNA–protein cross-links formed with DNA polymerase β in vivo. *PNAS* *112*, 8602–8607.

Rahni, R., Birnbaum, K.D. (2019). Week-long imaging of cell divisions in the Arabidopsis root meristem. *Plant Methods* *15*, 30.

Raschle, M., Smeenk, G., Hansen, R.K., Temu, T., Oka, Y., Hein, M.Y., Nagaraj, N., Long, D.T., Walter, J.C., Hofmann, K., et al. (2015). Proteomics reveals dynamic assembly of repair complexes during bypass of DNA cross-links. *Science* *348*, 1253671–1253671.

Reef, R., Dunn, S., Levy, O., Dove, S., Shemesh, E., Brickner, I., Leggat, W., Hoegh-Guldberg, O. (2009). Photoreactivation is the main repair pathway for UV-induced DNA damage in coral planulae. *Journal of Experimental Biology* *212*, 2760–2766.

Regairaz, M., Zhang, Y.-W., Fu, H., Agama, K.K., Tata, N., Agrawal, S., Aladjem, M.I., Pommier, Y. (2011). Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I–DNA complexes. *Journal of Cell Biology* 195, 739–749.

Robertson, K.D. (2001). DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 20, 3139–3155.

Rodríguez, M.C., Wawrzyńska, A., Sirko, A. (2014). Intronic T-DNA insertion in *Arabidopsis* NBR1 conditionally affects wild-type transcript level. *Plant Signaling & Behavior* 9, e975659.

Röhrig, S., Schröpfer, S., Knoll, A., Puchta, H. (2016). The RTR Complex Partner RMI2 and the DNA Helicase RTEL1 Are Both Independently Involved in Preserving the Stability of 45S rDNA Repeats in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 12, e1006394.

Sargent, R.G., Brenneman, M.A., Wilson, J.H. (1997). Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Molecular and Cellular Biology* 17, 267.

Sawasaki, T., Takahashi, M., Goshima, N., Morikawa, H. (1998). Structures of transgene loci in transgenic *Arabidopsis* plants obtained by particle bombardment: Junction regions can bind to nuclear matrices. *Gene* 218, 27–35.

Schneeberger, K., and Weigel, D. (2011). Fast-forward genetics enabled by new sequencing technologies. *Trends in Plant Science* 16, 282–288.

Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Juul, T., Petersen, A.H., Nielsen, K.L., Jørgensen, J.-E., Weigel, D., Andersen, S.U. (2009). SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nature Methods* 6, 550–551.

Sehested, M., Jensen, P.B. (1996). Mapping of DNA topoisomerase II poisons (etoposide, clerocidin) and catalytic inhibitors (aclerubicin, ICRF-187) to four distinct steps in the topoisomerase II catalytic cycle. *Biochemical Pharmacology* 51, 879–886.

Seol, J.-H., Shim, E.Y., Lee, S.E. (2018). Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 809, 81–87.

Serbyn, N., Noireterre, A., Bagdiul, I., Plank, M., Michel, A.H., Loewith, R., Kornmann, B., Stutz, F. (2020). The Aspartic Protease Ddi1 Contributes to DNA-Protein Crosslink Repair in Yeast. *Molecular Cell* 77, 1066-1079.e9.

Sfeir, A., Symington, L.S. (2015). Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? *Trends in Biochemical Sciences* 40, 701–714.

Sharpe, H.B.A., Field, E.O., and Hellmann, K. (1970). Mode of Action of the Cytostatic Agent 'ICRF 159.' *Nature* 226, 524–526.

Stephan, A.K., Kliszczak, M., Morrison, C.G. (2011). The Nse2/Mms21 SUMO ligase of the Smc5/6 complex in the maintenance of genome stability. *FEBS Letters* 585, 2907–2913.

Stingele, J., Jentsch, S. (2015). DNA-protein crosslink repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 455–460.

Stingele, J., Schwarz, M.S., Bloemeke, N., Wolf, P.G., Jentsch, S. (2014). A DNA-Dependent Protease Involved in DNA-Protein Crosslink Repair. *Cell* 158, 327–338.

Stingele, J., Habermann, B., Jentsch, S. (2015). DNA–protein crosslink repair: proteases as DNA repair enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 40, 67–71.

Stingele, J., Bellelli, R., Alte, F., Hewitt, G., Sarek, G., Maslen, S.L., Tsutakawa, S.E., Borg, A., Kjær, S., Tainer, J.A., et al. (2016). Mechanism and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair by the DNA-Dependent Metalloprotease SPRTN. *Molecular Cell* 64, 688–703.

Stingele, J., Bellelli, R., Boulton, S.J. (2017). Mechanisms of DNA–protein crosslink repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 563–573.

Sun, H., and Schneeberger, K. (2015). SHOREmap v3.0: Fast and Accurate Identification of Causal Mutations from Forward Genetic Screens. In *Plant Functional Genomics*, J.M. Alonso, A.N. Stepanova, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 381–395.

Swenberg, J.A., Lu, K., Moeller, B.C., Gao, L., Upton, P.B., Nakamura, J., Starr, T.B. (2011). Endogenous versus Exogenous DNA Adducts: Their Role in Carcinogenesis, Epidemiology, and Risk Assessment. *Toxicol Sci* 120, S130–S145.

Takeda, S., Nakamura, K., Taniguchi, Y., Paull, T.T. (2007). Ctp1/CtIP and the MRN Complex Collaborate in the Initial Steps of Homologous Recombination. *Molecular Cell* 28, 351–352.

Taylor, E.M., Moghraby, J.S., Lees, J.H., Smit, B., Moens, P.B., Lehmann, A.R. (2001). Characterization of a Novel Human SMC Heterodimer Homologous to the *Schizosaccharomyces pombe* Rad18/Spr18 Complex. *MBoC* 12, 1583–1594.

Taylor, E.M., Copsey, A.C., Hudson, J.J.R., Vidot, S., Lehmann, A.R. (2008). Identification of the Proteins, Including MAGEG1, That Make Up the Human SMC5-6 Protein Complex. *MCB* 28, 1197–1206.

Thoma, F. (1999). Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *The EMBO Journal* 18, 6585–6598.

Torres-Rosell, J., Machín, F., Farmer, S., Jarmuz, A., Eydmann, T., Dalgaard, J.Z., Aragón, L. (2005). SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions. *Nat Cell Biol* 7, 412–419.

Tripathy, B.C., Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1621–1633.

Trujillo, K.M., Sung, P. (2001). DNA Structure-specific Nuclease Activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50·Mre11 Complex. *J. Biol. Chem.* 276, 35458–35464.

Truong, L.N., Li, Y., Shi, L.Z., Hwang, P.Y.-H., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M.W., Wu, X. (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 7720–7725.

Tzfira, T. (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics* 20, 375–383.

Uhlmann, F., Lottspeich, F., Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400, 37–42.

Vaz, B., Popovic, M., Ramadan, K. (2017). DNA–Protein Crosslink Proteolysis Repair. *Trends in Biochemical Sciences* 42, 483–495.

Vondrova, L., Adamus, M., Nociar, M., Kolesar, P., Oliver, A.W., Palecek, J.J. (2019). A role of the Nse4 kleisin and Nse1/Nse3 KITE subunits in the ATPase cycle of SMC5/6 (Genetics).

Wang, J.C. (1996). DNA Topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 635–692.

Wang, Z., Song, Y., Li, S., Kurian, S., Xiang, R., Chiba, T., Wu, X. (2019). DNA polymerase θ (POLQ) is important for repair of DNA double-strand breaks caused by fork collapse. *Journal of Biological Chemistry* 294, 3909–3919.

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*. *Plant Cell* 21, 2688–2699.

Whitman, S.P., Hackanson, B., Liyanarachchi, S., Liu, S., Rush, L.J., Maharry, K., Margeson, D., Davuluri, R., Wen, J., Witte, T., et al. (2008). DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication. *Blood* 112, 2013–2016.

Williams, R.S., Williams, J.S., Tainer, J.A. (2007). Mre11–Rad50–Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 28th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochem. Cell Biol.* 85, 509–520.

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.

Yuan, D., Lai, J., Xu, P., Zhang, S., Zhang, J., Li, C., Wang, Y., Du, J., Liu, Y., Yang, C. (2014). AtMMS21 regulates DNA damage response and homologous recombination repair in *Arabidopsis*. *DNA Repair* 21, 140–147.

Zabradý, K., Adamus, M., Vondrova, L., Liao, C., Skoupilova, H., Novakova, M., Jurcisinova, L., Alt, A., Oliver, A.W., Lehmann, A.R., et al. (2016). Chromatin association of the SMC5/6 complex is dependent on binding of its NSE3 subunit to DNA. *Nucleic Acids Res* 44, 1064–1079.

Zapatka, M., Pociño-Merino, I., Heluani-Gahete, H., Bermúdez-López, M., Tarrés, M., Ibars, E., Solé-Soler, R., Gutiérrez-Escribano, P., Apostolova, S., Casas, C., et al. (2019). Sumoylation of Smc5 Promotes Error-free Bypass at Damaged Replication Forks. *Cell Reports* 29, 3160-3172.e4.

Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J.-K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 489–506.

Zhao, X., Blobel, G. (2005). From The Cover: A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 4777–4782.