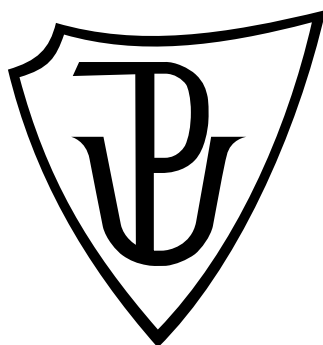


Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza genů podílejících se na opravě
toxických DNA-proteinových komplexů
u huseníčku rolního**

Jitka Jemelková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma *Analýza genů podílejících se na opravách toxických DNA-proteinových komplexů u huseníčku rolního, Arabidopsis thaliana*, zpracovala samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů a pod vedením Mgr. habil. Aleše Pečinky, Ph.D.

V Olomouci dne: 10. 5. 2019

.....

Jemelková Jitka

SOUHRN

V bakalářské práci jsem se zabývala studiem genů podílejících se na opravě DNA-proteinových komplexů u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) indukovaných pomocí metyltransferázového inhibitoru zebularinu.

V teoretické části jsem se zaměřila na příčiny vzniku poškození molekuly DNA a na následky, které tyto poškození způsobují, ale také na jejich opravu. Větší zájem jsem přikládala DNA-proteinovým crosslinkům, jež jsou stěžejním tématem mé bakalářské práce. V práci je objasněn také princip nových sekvenačních metod, které se využívají pro analýzu a mapování genů.

V experimentální části jsem analyzovala geny, které se podílejí na opravách DNA-proteinových crosslinků. Při této analýze jsem využívala senzitivity mutagenizovaných rostlin na methyltransferázový inhibitor zebularin, jenž tvoří DNA-proteinové crosslinky s methyltransferázami. Senzitivita byla u rostlin hodnocena po týdenním růstu na médiu s přídavkem zebularinu a projevovala se krátkou délkou kořínků. Rovněž jsem si osvojila techniky komplementačního křížení a ze získaných výsledků komplementace jsem identifikovala tři kandidátní linie nesoucí známé mutace v genu *SMC6B*. V programu Geneious jsem vytvořila strukturu genu *SMC6B* a navrhla postup, který by vedl k jeho osekvenování v kandidátních liniích. Navržený postup jsem uplatnila u jedné kandidátní rostliny. Během této analýzy bylo nutné optimalizovat podmínky polymerázové řetězové reakce. U kandidátních linií, které nesou mutace způsobující citlivost k DNA-proteinových crosslinkům v neznámých genech, jsem se dopracovala k získání F₂ generace hybridních semen pomocí komplementačního křížení s nemutagenizovanou rostlinou W-35 (Col-0). Tato mapovací populace je nezbytná pro další výzkum zasažených genů.

Cílem této práce bylo přispět k identifikaci genů podílejících se na opravách DNA-proteinových komplexů u modelové rostliny huseníčku rolního. Pochopení všech funkčních mechanismů by mohlo vést k efektivnějšímu využití léků při léčbě různých typů onemocnění. Materiály získané během výzkumu budou sloužit k dalším analýzám zaměřující se na objasnění principu oprav DNA-proteinových komplexů.

SUMMARY

In my bachelor thesis, I have been dealing with the study of genes involved in the repair of DNA-protein complexes induced by a methyltransferase's inhibitor zebularine in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

The theoretical part is focused on the causes of damage in molecule DNA and their consequences, as well as means of repair of these damages. The main topic of my thesis are DNA-protein crosslinks. The thesis also explains the principle of new sequencing methods, which are used for gene analysis and mapping.

In the experimental part, I analyzed the genes involved in the repair of DNA-protein crosslinks. I used the sensitivity of mutagenized plants to the methyltransferase's inhibitor zebularine, which forms DNA-protein crosslinks with methyltransferases. Sensitivity of plants was evaluated after the weekly growth in zebularine-added medium and it was proofed by the short root length. I also applied the techniques of complementation crossing, results of which identified three candidate lines carrying known mutations in the gene *SMC6B*. The software Geneious was used for creating a structure of the gene *SMC6B* and for finding an appropriate procedure that would lead to sequencing the *SMC6B* gene in the candidate lines. I applied the proposed procedure for sequencing of one candidate plant. During this analysis, it was necessary to optimize conditions of the polymerase chain reaction. For the candidate lines, carrying mutations which cause the DNA-protein crosslink sensitivity in unknown genes, I was able to obtain F₂ generation of hybrid seeds by complementing a crossing of the candidate lines with a non-mutagenized W-35 plant (Col-0). This mapping population is necessary for the next research on the affected genes.

The aim of this work was to contribute to the identification of genes involved in the repair of DNA-protein complexes in the *Arabidopsis thaliana*. The understanding of all functional mechanisms could lead to a more effective use of drugs in the treatment of various types of diseases. The material, which was obtained during the research, will be used for the next research to clarify the principle of the DNA-protein complex repair.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. habil. Aleši Pečinkovi, Ph.D. za věnovaný čas, ochotu, trpělivost a odborné vedení při zpracovávání bakalářské práce. Dále patří velké díky celému výzkumnému týmu, jmenovitě především Mgr. Haně Jeřábkové Ph.D, Mgr. Kláře Procházkové a Mgr. Evě Dvořák Tomašíkové Ph.D.

OBSAH

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	vii
SEZNAM OBRÁZKŮ	ix
SEZNAM TABULEK.....	x
1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE.....	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 Genomová stabilita, poškození DNA a reparace.....	3
3.1.1 Příčiny vzniku poškození DNA a jejich důsledky	3
3.1.2 Typy poškození DNA	5
3.2 DNA-protein crosslinky	7
3.2.1 Neenzymatické DPCs.....	7
3.2.2 Enzymatické DPCs	8
3.3 Metylace DNA a DNA metyltransferázové inhibitory	9
3.3.1 Metylace DNA u rostlin	9
3.3.2 Nukleotidové analogy jako inhibitory metyltransferáz	9
3.4 Opravné mechanismy	11
3.5 Identifikace mutantů a genetický skrínig	13
3.5.1 Indukce mutací	13
3.5.2 Dopředná genetika	14
3.5.3 Reverzní genetika	16
3.6 Hlavní úloha projektu	18
4 MATERIÁL A METODY.....	19
4.1 Biologický materiál	19
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	20
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	23
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	24
4.4.1 Sterilizace semen	24
4.4.2 Genetický skrínig.....	24
4.4.3 Analýza délky kořínků	24
4.4.4 Hybridizační křížení.....	25
4.4.5 Mapovací populace	25
4.4.6 Izolace DNA.....	25
4.4.7 Izolace RNA a syntéza cDNA	26
4.4.8 Stanovení koncentrace nukleových kyselin.....	26
4.4.9 Polymerázová řetězová reakce	26

4.4.10	Gelová elektroforéza na agarózovém gelu	27
4.4.11	Sekvenování gDNA	28
5	VÝSLEDKY	29
5.1	Selektivní skrínink citlivých kandidátů.....	29
5.2	Rozlišení falešně pozitivních a pravých kandidátů.....	30
5.3	Identifikace genů komplementací.....	33
5.4	Validace mutace v genu <i>SMC6B</i> u vybraných kandidátů	36
5.5	Vytvoření hybridní F ₂ generace kandidátů nesoucí neznámé mutace	39
6	DISKUSE	42
7	ZÁVĚR.....	45
8	LITERATURA	46
9	PŘÍLOHY	53

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATM	ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED kináza
ATP	adenosintrifosfát
ATR	ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD-3 RELATED kináza
BER	bázová excizní oprava
bp	bázové páry
Cas9	CRISPR-asociovaný protein 9, nukleáza Cas9
cDNA	kódující DNA
CMT	chromometyláza
CRISPR	segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit (clustered regularly interspaced short palindrom)
crRNA	CRISPR RNA
Dmc1	Disrupted meiotic cDNA1 rekombináza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PKc	DNA-dependentní protein kináza
DNMT	DNA-metyltransferáza
DPC	DNA-protein crosslink
DSB	dvouvláknový zlom (double-strand break)
dsRNA	dvouvláknová RNA
EMS	ethylmetan sulfonát
GGNER	globální genomová nukleotidová excizní oprava (global genome)
HNH	endonukleázová doména pojmenovaná dle charakteristických zbytků histidinu a asparagin
HR	homologní rekombinace
ICL	crosslinky mezi dvěma řetězci DNA (inter-strand crosslink)
MET1	DNA Metyltransferáza 1
MMR	oprava řízená metylací (mismatch repair)
MMS	methylmetan sulfonát

MS	Murashige a Skoog médium
NER	nukleotidová excizní oprava
NGS	nová generace sekvenování (next generation sequencing)
NHEJ	nehomologní spojování konců
PCR	polymerázová řetězová reakce
Pol	polymeráza
Rad51	rekombináza 51 citlivá k záření (Radiation sensitive 51)
RF	replikační vidličky (replication forks)
RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	interferující RNA
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RuvC	endonukleázová doména pojmenovaná dle proteinu <i>Escherichia coli</i> účastnící se opravy DNA
siRNA	malá interferující RNA (small/short interfering RNA),
SMC	komplex udržující strukturu chromozomů (Structural maintenance of chromosomes)
<i>SMC6B</i>	podjednotka SMC5/6 komplexu (Structural maintenance of chromosomes)
SQ/TQ	motivy, kde se nachází serin (S) nebo threonin (T) následovaný glutaminem (Q)
SSB	jednovláknový zlom (single-strand break)
TC-NER	nukleotidová excizní oprava spojená s transkripcí (transcription-coupled)
T _m	teplota tání (melting temperature)
TOP (1, 2)	Topoizomeráza (1, 2)
Tracr-RNA	transaktivační CRISPR RNA
UTR	nepřekládané oblasti (untranslated regions)
UV	ultrafialové záření
WT	nemutovaná forma (wild type)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Typy poškození DNA.....	6
Obrázek 2: Strukturní srovnání cytidinu a zebularinu	10
Obrázek 3: Diagram SHORE mapování	15
Obrázek 4: Tři varianty Cas9 nukleázy.....	17
Obrázek 5: Schématické znázornění selekce senzitivních M2 rostlin huseníčku rolního na zebularin.....	30
Obrázek 6: Rozlišení citlivých kandidátů porovnáním poměru průměrných délek kořínek na médiu obsahující zebularin a na médiu bez zebularinu.....	31
Obrázek 7: Princip komplementačního testování homozygotních mutantů	33
Obrázek 8: Komplementační křížení kandidátní rostliny 9A-10.....	34
Obrázek 9: Komplementační křížení kandidátní rostliny 9A-2.....	35
Obrázek 10: Struktura genu <i>SMC6B</i>	36
Obrázek 11: F ₂ hybridní rostliny 9B-43 x W-35	40
Obrázek 12: F ₂ hybridní rostliny 9B-38 x W-35	40

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam rostlinných linií	19
Tabulka 2: Růstové podmínky.....	19
Tabulka 3: Oligonukleotidy použité pro PCR amplifikaci a Sangerovo sekvenování	21
Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci.....	27
Tabulka 5: Podmínky PCR reakce.....	27
Tabulka 6: Porovnání kořínků testovaných rostlin na médiu bez zebularinu a se zebularinem ..	32
Tabulka 7: Oligonukleotidy použité při amplifikaci daných oblastí genu <i>SMC6B</i>	37
Tabulka 8: Složení PCR reakční směsi pro amplifikaci genu <i>SMC6B</i>	37
Tabulka 9: Podmínky PCR amplifikace pro získání produktů A–L genu <i>SMC6B</i>	37

1 ÚVOD

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je během své existence vystavena řadě faktorům, které narušují její funkční strukturu. Faktory indukují různá poškození, jako jsou vláknové zlomy, záměny bází či crosslinky vznikající mezi dvěma molekulami DNA či mezi DNA a proteinem (DPC). Vzhledem k tomu, že jsou vazby crosslinku kovalentní, představují tyto DPCs fyzickou bariéru pro enzymy podílející se na replikaci a transkripci. Pokud nedojde k opravě těchto poškození, vznikají mutace, jež mají vliv nejen na stabilitu genomu, ale i na funkci jednotlivých genů.

Stabilní analog cytidinu, zebularin, je schopen vytvářet kovalentním spojením s DNA-metyltransferázami. Tímto způsobem dochází k jeho začlenění do DNA či RNA a indukuje v těchto molekulách ztrátu metylace, která je důležitá pro replikaci, rekombinaci, buněčnou expresi i opravu DNA. Vlastnosti této látky byly využity pro studium a identifikaci genů, které se podílejí na opravách DNA ve vybrané populaci huseničky rolního (*Arabidopsis thaliana*), jež je mutagenizovaná alkylačním činidlem EMS.

2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše
- Prostudování uvedené odborné literatury
- Identifikace genů podílející 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)
- Vyhodnocení experimentálních výsledků

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Genomová stabilita, poškození DNA a reparace

Stabilita hlavní jednotky genetické informace, deoxyribonukleové kyseliny, je pro všechny buňky nezbytná. Nicméně během své existence bývá neustále vystavována mnoha endogenním metabolickým procesům a vlivům prostředí, které mohou v její struktuře způsobit určitá poškození (Holley *et al.*, 1965). Ta ovlivňují kódující schopnosti, průběh replikace či transkripce. Pokud nedojde k opravě těchto poškození, dochází ke genetickým změnám (mutacím) a v mnoha případech i k apoptóze (Naegeli, 1997). Aby si buňka zachovala svou genomovou stabilitu, vyvinuly se u ní specializované systémy, které dokáží aktivovat specifický opravný mechanismus v závislosti na typu poškození (Sancar *et al.*, 2004).

3.1.1 Příčiny vzniku poškození DNA a jejich důsledky

Exogenní faktory

Mezi exogenní faktory se řadí ionizující a neionizující záření. Rostliny mají na rozdíl od živočichů vyšší toleranci vůči UV záření (100–400 nm), jelikož jejich buněčná stěna obsahující vosk a suberin je schopna toto záření odrážet nebo absorbovat. V buněčné stěně se rovněž akumulují flavonové a fenolické látky, které přispívají k neutralizaci volných radikálů. Účinkům UV záření je převážně vystavena epidermální vrstva buněk, omezeně však může záření pronikat i hlouběji do pletiv. (Ries *et al.*, 2000; The IARC group, 2012).

UV záření je velmi snadno pohlcováno purinovými a pyrimidinovými bázemi v DNA, které se tak dostávají do reaktivnějšího excitovaného stavu. Nejčastějším typem poškození způsobené UV zářením je produkce pyrimidinových (cytosinových a thyminových) dimerů. (Grossman *et al.*, 1988; Reef *et al.*, 2009). Vznikají v důsledku tvorby kovalentně křížových vazeb mezi dvěma sousedními pyrimidinovými molekulami (Snustad *et Simmons*, 2017) a jejich následkem je blokování replikace či transkripce (Setlow *et al.*, 1963).

Ionizující záření ($\lambda < 10$ nm) má vůči neionizujícímu UV záření schopnost indukovat změny nejen na povrchu, ale i v hlubších vrstvách. Považuje se za více „agresivní“, jelikož může způsobit ionizaci jednotlivých atomů. Ionizující záření se dělí na α , β , γ záření a rentgenové záření známé také pod názvem X-rays, neboli záření indukované X paprsky. Ačkoliv α a β záření je možné zastavit pomocí fyzické bariéry, X a γ záření mají schopnost větší penetrace a stávají se hrozbou pro organismus (Reisz *et al.*, 2014). Ionizující záření v rostlinných buňkách nejvíce ovlivňuje vodu a kvůli vzájemné interakci dochází ke vzniku reaktivních radikálů kyslíku (ROS), zejména k radikálům hydroxylovým. Za aerobních podmínek může ionizující záření zapříčinit dvouvláknové zlomy, jejichž důsledkem mohou být chromozomální zlomy, inverze, duplikace

nebo translokace. Za anaerobních podmínek vznikají také toxické kovalentní vazby (tzv. crosslinky) (Britt, 1996; Reisz *et al.*, 2014).

Chemické modifikace nukleotidů mohou být vyvolány rovněž alkylačními činidly, jejich působení vede k chybnému párování či výměně bází (Kim *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2010). Alkylační činidla obvykle způsobují mutace, jako je tranzice a transverze. Pojem tranzice značí záměnu purinových bází – adeninu (A) za guanin (G) či naopak, nebo pyrimidinových bází – cytosin (C) za thymin (T) a obráceně. Transverze je známá jako záměna purinových bází za pyrimidinové či pyrimidinových za purinové. Ačkoliv jsou všechny báze citlivé vůči alkylaci, nejvíce alkylačnímu poškození podléhají purinové báze. Pokud nejsou tyto změny správně opraveny, dochází ke vzniku dvouvláknových zlomů či k vytvoření crosslinků (Britt, 1996).

Mezi alkylační činidla se řadí např. ethylmetan sulfonát (EMS) a metylmetan sulfonát (MMS). MMS způsobuje vznik toxických apurinových míst, což může vést k blokaci DNA polymerázy. Při působení MMS dochází k metylaci N⁷-guaninu a N³-adeninu, jejichž následkem je transverze T:A na G:C či transzice A:T na G:C. U rostlin je toto alkylační činidlo široce používáno pro studium reparace poškozené DNA, zejména u homologní rekombinace (HR) (Kim, 2006; Pecinka *et Liu*, 2014). Při působení EMS dochází k ethylaci guaninu za vzniku O⁶-ethylguaninu, který je schopen se párovat s thyminem (T), ale nikoliv s cytosinem (C). Během reparace se originální pár G:C zamění za pár A:T. EMS našel uplatnění jako mutagen pro tvorbu mutovaných populací pro genetické skríny. (Kim *et al.*, 2006).

Endogenní faktory

DNA je místem, kde velmi často dochází k hydrolytickým reakcím. Mezi hydrolytická poškození se řadí depurinace, během níž se rozruší glykosidické vazby mezi purinovými bázemi a DNA. Proces depurinace je poměrně pomalý, avšak ve velkém genomu může indukovat ztrátu až několika tisíc purinových bází za den. Pokud nedojde k opravě apurinových bází, replikace a transkripce se zablokují, což je pro replikující buňky letální (Naegeli, 1997).

Další hydrolytická poškození vznikají během procesu deaminace. Příkladem tohoto typu poškození může být cytosin, který se deaminuje na uracil a 5-metylcytosin deaminující se na thymin. Oba tyto produkty se párují společně s adeninem a jsou potenciálně mutagenní. Uracil je často rozpoznán jako nevyhovující báze v DNA, zatímco thymin vzniklý deaminací 5-metylcytosinu nemůže být rozpoznán, protože se v DNA přirozeně nachází. Následkem poté bývá tranzice bázových párů C:G na T:A, která je v mnoha případech příčinou mutací (Britt, 1996).

Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) jsou produkovány během buněčného dýchání, které se uskutečňuje v mitochondriích a u rostlin také během fotosyntézy. ROS vznikají i v důsledku stresu v případě, že je rostlina vystavena intenzivnímu dopadajícímu světlu či extrémním teplotám (Tripathy *et Oelmüller*, 2012). Některé ROS mohou vzniknout specifickou reakcí na

růstové faktory a cytokiny. Za normálních fyziologických podmínek zastávají funkci při regulaci signálních drah, kde se uplatňují jako sekundární přenašeči a rovněž při expresi genů, proto je jejich přítomnost v organismu důležitá (Barzilai *et Yamamoto*, 2004). Nicméně ROS tvoří hlavní třídu endogenních toxických látek, jež jsou produkovány jako vedlejší produkty během buněčného dýchání. Mezi ROS patří superoxidový aniontový radikál ($\cdot\text{O}_2^-$), peroxid vodíku (H_2O_2) či hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) (Barzilai *et Yamamoto*, 2004). Nahromadění těchto radikálů se silným oxidačním potenciálem může mít za následek poškození široké škály biologických molekul včetně DNA. Oxidace bází DNA vede ke vzniku jednovláknových či dvouvláknových zlomů či k oxidaci proteinů a lipidů. V krajním případě mohou ROS zapříčinit buněčnou smrt (Hu *et al.*, 2016; Tripathy *et Oelmüller*, 2012).

3.1.2 Typy poškození DNA

Záměna bází

Jak již bylo zmíněno záměna bází může být zapříčiněna několika faktory. Nejčastěji vznikají působením alkylačních činidel, jakými jsou EMS či MMS. Záměnu bází rovněž indukují hydrolytické procesy či ionizující záření. Tato poškození jsou opravena pomocí bázové excizní reparace (BER) a pomocí DNA alkyltransferáz (Krokan *et Bjørås*, 2013). Záměna bází se rozlišuje na dva typy – tranzici a transverzi. Substituce bází může vést ke třem rozdílným efektům. Vznikají tzv. tiché mutace, kdy sice dojde k záměně báze, avšak nově vzniklý triplet kóduje stejnou aminokyselinu jako triplet původní. Nedojde tedy k funkční změně. Druhý typ mutací představují mutace beze smyslu, kdy nově kódující triplet kóduje terminální stop kodon. Třetím typem jsou pozměňující mutace, jejichž triplet kóduje aminokyselinu, která se liší od původní a způsobuje tak funkční změny (Lodish *et al.*, 2013).

Vláknové zlomy

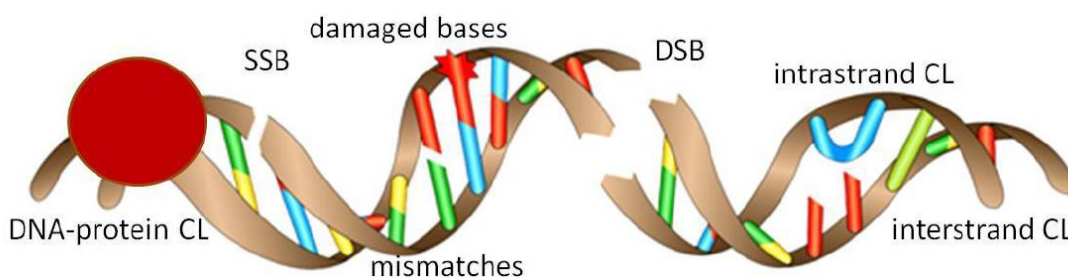
Vláknové zlomy jsou dvojího typu – jednovláknové (single-strand breaks, SSB) nebo dvouvláknové (double-strand breaks, DSB). Na jejich vzniku se podílí ionizující záření, různá chemoterapeutická léčiva a endogenní ROS. Mohou vzniknout rovněž následkem mechanického stresu působícího na chromozomy (Khanna *et Jackson*, 2001). SSBs a DSBs mají odlišné opravné mechanismy. Pro reparaci SSBs se využívá nukleotidová excizní oprava (NER) či tzv. mismatch reparace (MMR). U DSBs fungují dva opravné procesy – homologní rekombinace (HR) a nehomologní spojování konců (nonhomologous end-joining, NHEJ). HR používá pro reparaci především sesterské chromatidy nebo vzácněji homologní chromozomy, zatímco NHEJ je méně přesné a jednoduše spojuje dohromady dva nehomologní konce DNA (Rich *et al.*, 2000). Principy některých typů oprav budou vysvětleny v samostatné kapitole.

DNA-crosslinks

DNA crosslinky vznikají v důsledku kovalentního spojení dvou nukleotidových zbytků přítomných na jednom řetězci (tzv. intra-strand crosslink) nebo mezi dvěma řetězci DNA (inter-strand crosslink, ICL). Tvorba DNA crosslinků závisí na přítomnosti dvou reaktivních skupin v jedné alkylační molekule. Pokud dvě reaktivní skupiny reagují se dvěma bázemi umístěnými na opačných řetězcích DNA, dojde k vytvoření ICL. Cílovými místy na molekule DNA jsou obvykle N⁷-guanin a N²-aminoskupina guaninu nukleotidových zbytků. Pro reparaci intra-strand crosslinks se využívá mechanismus NER. U inter-strand crosslinks dochází ke kombinaci několika reparačních mechanismů – zejména HR a NER. (Huang *et Li*, 2013).

DNA-protein crosslinky

Interakce mezi proteiny a DNA jsou nezbytnou součástí mnoha procesů, které zajišťují správnou expresi genů nebo modifikace DNA a histonů. Nicméně tyto krátkodobé DNA-protein interakce se mohou vyvinout v dlouhodobé z důvodu exogenních a endogenních jevů, které působí na buňku (Stingele *et Jentsch*, 2015). Tyto faktory způsobí tvorbu kovalentní vazby mezi proteinem a DNA za vzniku DNA-protein crosslinků (DPCs) (Ide *et al.*, 2015). Pokud nejsou tyto léze opraveny, může dojít ke vzniku mutací, genomických nestabilit, dokonce je ohrožena samotná existence buňky (Klages-Mundt *et Li*, 2017). Jelikož se ve své práci zabývám analýzou genů, jež se podílejí na opravách DPCs, bude DNA-proteinovým crosslinkům vyhrazena samostatná kapitola.



Obrázek 1: Typy poškození DNA

Schématické znázornění různých typů poškození DNA, jako je jednovláknový a dvouvláknový zlom (SSB, DSB), záměny a chyby párování bází, DNA a proteinové komplexy tzv. crosslinky (CL) (upraveno, Natural protective mechanism against cancer).

3.2 DNA-protein crosslinky

Genomová DNA je neustále ve styku s regulačními a strukturními proteiny, které mají vliv na její tvar a funkční procesy. Mohou ovlivnit správný průběh replikace a transkripce. Spojení mezi těmito proteiny a DNA bývají za fyziologických podmínek reverzibilní (Ide *et al.*, 2011). V případě nutnosti se totiž navázaný protein oddělí nebo přemístí na jiné místo v DNA. Díky tomu se zpřístupní sekvence nukleotidů potřebné pro replikaci, transkripci či reparaci. Tento proces zajišťuje správnou expresi a přenos genetické informace. Vlivem endogenních a exogenních činidel může dojít k trvalému zasíťování DNA proteiny a vytvoření kovalentní vazby. Doposud jsou DPCs předmětem studií, které se snaží objasnit jejich vznik, vliv na expresi a samotnou reparaci. Dle způsobu vzniku a indukce se DPCs rozlišují na enzymatické a neenzymatické (Stingele *et Jentsch*, 2015).

3.2.1 Neenzymatické DPCs

Zatímco enzymaticky indukované DPCs vznikají působením činidla na jeden specifický protein, u neenzymatických DPCs se může crosslinkující činidlo zachytit na jakýkoliv protein, jež je lokalizován v blízkosti DNA. K jejich trvalému zasíťování dochází po působení různých typů záření, metalických iontů a reaktivních komponentů, jako jsou aldehydy. (Stingele *et Jentsch*, 2015).

Aldehydy indukované DPCs

Reaktivní aldehydy vznikají během aminokyselinového metabolismu a oxidativní demetylace. Pokud je karbonylový uhlík aldehydu elektrofilní, může reagovat s nukleofily v okolním prostředí. Jestliže se vyskytuje v blízkosti chromatinu, může reagovat s aminoskupinami, které se nachází v bázích DNA (Klages-Mundt *et Li*, 2017; Walport *et al.*, 2012). Karbonylový uhlík aldehydu vytváří metylenové můstky mezi nukleofilními aminokyselinovými zbytky (lysin nebo cystein) a DNA bázemi (nejčastěji guanin) (Swenberg *et al.*, 2011).

Nejvíce prostudovaným aldehydem je formaldehyd. Jeho produkce probíhá uvnitř chromatinu demetylací histonů. Ve větším množství je formaldehyd pro genom toxický (Swenberg *et al.*, 2011). To, že se tento toxin produkuje v blízkosti DNA, může být pro buňku nebezpečné. Z toho důvodu se v buňce nachází enzymy – aldehyd dehydrogenázy, které učiní formaldehyd netoxickým. Tento mechanismus je však ovlivněn množstvím vyprodukovaného formaldehydu. Pokud bude mít koncentrace tendenci růst, může se očekávat větší výskyt DPCs (Kuykendall *et Bogdanffy*, 1994; Klages-Mundt *et Li*, 2017).

DPCs indukované ionizujícím zářením

Tvorba DPCs ionizujícím zářením není zatím zcela objasněna. Ionizující záření vyvolá radiolýzu molekul vody, jejíž výsledkem jsou reaktivní hydroxylové radikály reagující s DNA a proteiny (Barker *et al.*, 2005). Stingele a Jentsch (2015) zmiňují, že tvorba DSB a DPC je podmíněna

množstvím kyslíku, který je přítomný v době ozařování. DPCs vznikají v hypoxických podmínkách, tedy při menším množství kyslíku, zatímco DSBs potřebují pro svoji tvorbu více kyslíku. DPCs představují pro buňku menší ohrožení než DSBs, z čeho vyplývá, že hypoxické buňky jsou vůči ionizujícímu záření více odolné (Stinglee *et Jentsch*, 2015).

3.2.2 Enzymatické DPCs

Mnoho enzymatických reakcí ovlivňujících DNA vyžaduje tvorbu reakčních meziproductů. Během těchto reakcí se enzym kovalentně spojuje s DNA. Mezi tyto enzymy se řadí topoizomerázy, apurinové a apyrimidinové lyázy, DNA glykosylázy, DNA metyltransferázy a DNA polymerázy. Kovalentní vazba mezi těmito enzymy a DNA je obvykle krátkodobá, avšak může dojít k jejich trvalému zachycení a vytvoření stabilních DPCs. Mezi nejvýznamnější a nejvíce studované enzymy, které tvoří DPCs, patří topoizomerázy.

DPCs spojené s Topoizomerázou 1

Topoisomeráza 1 (TOP1) je enzym vážící se na 3' konec jednovláknového zlomu na DNA pomocí tyrosinyl-fosfodiesterové vazby (Ide *et al.*, 2015). TOP1 zbavuje DNA torzálního napětí našťípnutím jednoho vlákna DNA. Tento štěp má za následek SSB s volným 5'OH koncem. TOP1 se navazuje na 3' konec zlomu. 5' konec je volný a rotuje kolem netknutého vlákna DNA, čímž dochází k uvolnění torzálního stresu. Po znovunavázání je následně TOP1 uvolněna. Jakékoliv strukturální deformace vedou k permanentnímu zachycení TOP1, vytvoření kovalentní vazby a tvorby DPCs. Tyto deformace mohou být způsobeny malými molekulami, jako jsou camptothecin a jeho deriváty (Stinglee *et Jentsch*, 2015).

DPCs spojené s Topoizomerázou 2

Topoisomeráza 2 (TOP2) je nezbytná pro všechny eukaryotické buňky. Jedná se o enzym, který je součástí struktury jaderné matrix. Hraje důležitou roli během replikace a je zodpovědný za kondenzaci a segregaci chromozomů (Larsen *et al.*, 1996). Příčinou jeho dysfunkce má buňka sklon k aberativní mitóze, která vede k endoreduplikaci, polyploidii a eventuálně i k buněčné smrti (Cortés *et al.*, 2003).

TOP2 je zodpovědná za krátkodobý dvouvláknový zlom, díky kterému dochází k uvolnění torzálního napětí. S DNA vytváří komplex, zvaný též jako „cleavage complex“. Interakce enzymu s aktivními místy tyrosinových zbytků na 5' konci vlákna DNA se uplatňuje pomocí tyrosinyl-fosfodiesterových vazeb. Skrze tyto vazby vzniká dvouvláknový zlom. Pokud nedojde k inhibici TOP2, uvolnění tlaku může proběhnout bez potíží. Dojde ke spojení rozštěpených konců, čímž se vytvoří celistvé vlákno (Gibson *et al.*, 2013).

Tento krok je pro přežití buňky velmi rizikový a stává se tak podstatnou hrozbou pro celý genom. Pokud replikační a transkripční mechanismus na tomto komplexu selže, vytvoří se trvalý DSB, který je nutno opravit. Ne vždy je však oprava zdařilá a buňka přežije.

3.3 Metylace DNA a DNA metyltransferázové inhibitory

3.3.1 Methylace DNA u rostlin

Methylace je označována za konzervativní epigenetickou modifikaci, která je nezbytná pro regulaci genů a genomovou stabilitu. Ovlivňuje růst rostlin a rovněž se podílí na umlčování repetitivní DNA. (Vanyushin, 2006). K metylaci cytosinu dochází po dokončení syntézy nového vlákna, jedná se tedy o postreplikační proces, který je katalyzován DNA-metyltransferázami (DNMTs), kdy S-adenosylmethionin je donorem metylové skupiny a DNMT ji přenáší na pátý uhlík cytosinu.

DNA metyltransferázy se u rostlin dělí na tři rodiny: (1) DNA METYLTRANSFERÁZA 1 (MET1), kam se řadí kontrolní metyltransferázy sekvencí CG; (2) DOMÉNOVĚ-PŘESKUPENÉ METYLTRANSFERÁZY (Domains-rearranged methyl-transferases, např. DMR2) jež jsou považovány za *de novo* metyltransferázy; (3) CHROMOMETYLÁZY modifikující CHG (CMT3) nebo CG (CMT2) sekvence a uplatňují se jak při metylaci udržovací, tak i *de novo*. Při metylaci *de novo* se metylují dosud nemodifikované DNA (Bird, 1999). Udržovací metylaci se obnovují metylační vzorce mezi buněčnými generacemi. Tento proces se odehrává po dokončení replikace, kdy udržovací metyltransferáza rozpozná modifikovaný cytosin v mateřském vlákne a podle něj metyluje cytosin na nově vytvořením vlákne (Bird, 2002). Rostlinné metyltransferázy jsou homologní s metyltransferázami savců – Dnmt1, Dnmt2 a Dnmt3 (Pikaard *et* Mittelsten Scheid, 2014).

CHROMOMETYLÁZY (CMTs) jsou důležitou třídou rostlinných specifických enzymů a jejich činnost je řízena metylací histonů (Jeandroz *et* Lamotte, 2017). V genomu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) jsou kódovány tři CMT – CMT1, CMT2 a CMT3. Nejvíce prostudovanou chromometylázou je CMT3, která reguluje růst a vývoj rostlin. Hlavní funkci CMT3 zastává během rozvoje květů a reprodukčních orgánů, v embryogenezi, má vliv na viabilitu semen a rovněž se uplatňuje při organogenezi. CMT3 udržuje u rostlin metylaci v CHG oblastech (H reprezentuje A, C nebo T). V rostlinách CMT3 zprostředkovává specifickou vazbu k dimetylovanému histonu H3 lysinu 9 (H3K9me2). Asociací CMT3 a H3K9me2 dochází k cílové metylaci DNA. (Jeandroz *et* Lamotte, 2017).

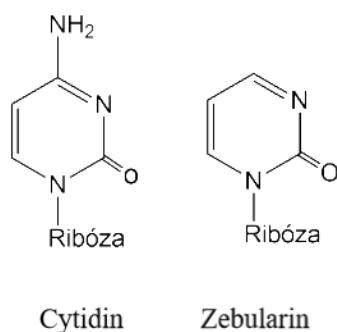
3.3.2 Nukleotidové analogy jako inhibitory metyltransferáz

Mezi inhibitory metyltransferáz jsou zařazovány chemické analogy cytidinu. Tyto analogy tvoří kovalentní produkty s DNA metyltransferázami a tím limitují jejich katalytickou aktivitu. Před inkorporací do DNA či RNA, jsou cytidinové analogy fosforylovány pomocí uridin/cytidinových kináz (Baubec *et al.*, 2009). Během S fáze buněčného cyklu jsou analogy vloženy místo cytosinu do řetězce DNA (Egger *et al.*, 2004). Vzhledem k tomu, že analogy cytidinu mají odlišnou strukturu v porovnání s fyziologickým cytidinem, dochází ke kovalentnímu spojení s DNMTs.

Vytvoří se DNMT-DNA nukleoproteinový produkt (DPC) který je spouštěčem buněčné odpovědi vedoucí k zastavení G₂ fáze buněčného cyklu nebo cytotoxicitě (Lim *et al.*, 2011). Aplikace cytidinových analogů způsobuje dočasnou redukci DNA metylace (Pecinka *et Liu*, 2014).

5-Azacytidin a 5-aza-2'-deoxycytidin jsou látky s inhibičními účinky vůči DNMTs mající široké uplatnění v protinádorové terapii. Obě látky jsou v roztocích velmi nestabilní, vysoce toxické a mají mnoho vedlejších účinků.

Zebularin (1-β-D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-on) je další popsáný inhibitor DNMTs. V porovnání s předešlými zmíněnými inhibitory je více stabilní ve vodním roztoku a také méně toxický. Aplikací zebularinu na buňky dochází ke snížení metylace DNA v závislosti na jeho dávce. Demethylace je spojena s transkripční reaktivací a částečnou dekondukcí heterochromatinu. (Baubec *et al.*, 2009). Vzhledem k chybějící 4' amino skupině na zebularinu dochází ke kovalentnímu navázání DNMTs na DNA a vytvoření DPCs. Ty představují fyzickou bariéru pro enzymy podílející se na replikaci a transkripci. Pokud nedojde k jejich odstranění, nastává kolize a DPCs se stávají se vysoce cytotoxickými. Tyto komplexní léze jsou opravovány dvěma typy cest – HR a NHEJ (Orta *et al.*, 2017). Struktura zebularinu je zobrazena na Obrázek 2.



Obrázek 2: Strukturní srovnání cytidinu a zebularinu

Struktura zebularinu se liší nepřítomností 4'aminoskupiny, jež je nezbytná pro metylaci, kvůli tomuto nedostatku se zebularin kovalentně váže na DNA-metyltransferázy a tvoří s nimi kovalentní komplexy.

3.4 Opravné mechanismy

Reparace chyb indukovaných UV zářením

Poškození, která jsou indukovaná UV zářením lze opravit dvěma způsoby. První z nich je závislý na světelném záření a oprava probíhá za účasti enzymů zvaných DNA-fotolyázy. Během fotoreaktivace fotolyáza využívá pro opravu světelné záření jako zdroj energie (Thoma, 1999). Fotolyáza identifikuje poškozená místa a ruší zde nesprávné kovalentní vazby. (Reef *et al.*, 2009). Kromě thyminových dimerů je DNA-fotolyáza schopna štěpit i cytosin-thyminové dimery nebo cytosinové dimery (Snustad *et Simmons*, 2017).

Druhý způsob reparace se uskutečňuje bez účasti viditelného světla a může tedy probíhat i ve tmě. Oprava je možná odstraněním poškozené báze (base-excision repair, BER), nukleotidu (nucleotide-excision repair, NER) či pomocí tzv. mismatch reparace (MMR). Tyto opravy jsou důležité především pro savce, jelikož se u nich ztratila schopnost fotoreaktivace (Thoma, 1999).

Bázová excizní oprava

BER opravuje chyby způsobené oxidací reaktivními radikály kyslíku (ROS) (Fortini, 2003), deaminací a alkylací. Tyto chyby nejsou však tak rozsáhlé, aby poškodily helixovou strukturu DNA (Krokan *et Bjørås*, 2013). BER usnadňuje opravu dvěma cestami – krátkou a dlouhou. Krátká cesta vede pouze k opravě jednoho nukleotidu, kdežto dlouhou cestou je možné opravit 2–6 nukleotidů (Robertson *et al.*, 2009). Nezbytnými enzymy podílející se na rozpoznání a vyjmutí poškozené báze jsou DNA glykosylázy (Krokan *et Bjørås*, 2013). Glykosylázy odstraní poškozené báze bez toho, aniž by došlo k poničení cukru či fosfátové skupiny. Vzniklá apyrimidinová a apuriová místa (AP) jsou rozpoznána endonukleázou (či AP-lyázou). Následně dochází k vyštěpení cukru z fosfátové vazby pomocí AP-lyázy nebo fosfodiesterázy. Původní nepoškozená DNA se obnoví prostřednictvím kombinace účinků opravné polymerázy a DNA ligázy (Britt, 1996).

Nukleotidová excizní oprava

Nukleotidová excizní oprava (NER) patří mezi hlavní způsoby ochrany buňky před různými strukturálními a chemickými rozdíly vyskytující se na DNA. Během reparace je možné opravit až 32 nukleotidů (Petruševa *et al.*, 2014). NER se uplatňuje při opravě pyrimidinových dimerů, jež jsou indukovány UV zářením. Podílí se také na opravě lézí, které jsou formovány environmentálními mutageny či chemoterapeutickými činidly. Během opravy se rozpoznávají velké strukturální deformace dříve než pozměněné báze (Mladenov *et Iliakis*, 2011).

Do reparace je zapojeno více než 30 proteinů. NER zahrnuje dvě dráhy, jejichž iniciace probíhá odlišným způsobem – NER spojená s transkripcí (transcription-coupled NER, TC-NER) a globální genomová NER (global genome NER, GG-NER). TC-NER je nezbytná pro eliminaci lézí na

transkribovaném vláknu aktivních genů, které blokují transkripci. GG-NER rozpoznává a odstraňuje léze napříč celým genomem. Je pomalejší a méně efektivní (Barzilai *et* Yamamoto, 2004).

Nehomologní spojování konců

Dvouvláknové zlomy DNA mohou být opraveny reparací, během níž dochází k nehomolognímu spojování konců (nonhomologous end joining, NHEJ). Tato reparační cesta je rychlejší než homologní rekombinace, nicméně při ní může docházet ke ztrátám bází na obou stranách zlomu nebo k jejich nekomplementární záměně.

Rozpoznání DSBs je zprostředkováno komplexem KU. Jedná se o heterodimer, který se skládá ze dvou proteinů – KU70 a KU80. Tyto protein se vážou se na DNA tak, že zlomené konce obepnou a vytvoří kruh. Na jednotky KU se připojují DNA-dependentní proteinkinázové podjednotky (DNA-PKcs) za vzniku aktivního enzymu. Tento holoenzym rozpoznává místa bohaté na Ser/Thr a fosforyluje nejen sám sebe, ale i další proteiny zúčastněné v opravné dráze, jejichž interakcí dochází ke konečnému spojení konců DNA (Davis *et al.*, 2008).

Homologní rekombinace

Homologní rekombinace (homologous recombination, HR) je vysoce regulovaný proces sloužící k opravě SSBs, DSBs i ICLs. Nepoškozená chromatida slouží jako templát pro opravu poškozené sesterské chromatidy (Kondo *et al.*, 2010). Do reparace jsou zapojeny konzervované enzymy z Rad51 rodiny, jež katalyzují párování homologních sekvencí v eukaryotických buňkách. Rad51 (Radiation sensitive51) zprostředkovává tvorbu spojů přes které se spojují homologní molekuly DNA. Je aktivní jak v mitotických, tak v meiotických buňkách. Při meióze je rovněž aktivní jeho meioticky-specifický homolog, rekombináza Dmc1 (Disrupted meiotic cDNA1). U kvasinek jsou Rad51 a Dmc1 rekombinázy lokalizovány v meiotickém jádru vedle sebe, avšak u vyšších organismů se nachází na opačných stranách meiotického DSBs (Kurzbaue *et al.*, 2012). Rad51 obsahuje ATPásovou doménu. Po navázání ATP dochází ke změně konformace Rad51 a jeho integraci s DNA, čímž vzniká presynaptické nukleoproteinové vlákno (Sehorn *et al.*, 2004). Při reparaci napomáhají pomocné enzymy, které presynaptické vlákno vnoří do duplexu sesterské chromatidy. Vzniká tzv. heteroduplex, na kterém se vyhledává homologní sekvence a poté dochází k nasyntetizování chybějícího úseku pomocí polymerázy, kde 3' konec poškozeného vlákna slouží jako primer. Pokud zůstává současně část vlákna vnořená do duplexu homologního chromozomu, vzniká struktura s Hollidayovými spoji. Ta musí být rozštěpena endonukleázami. Často v tomto případě dochází ke crossing overu. Při mitotickém dělení je HR vedena tak, aby Hollidayův spoj nevznikl (San Filippo *et al.*, 2008).

3.5 Identifikace mutantů a genetický skrínig

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je kosmopolitně rozšířená rostlina řadící se do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Jeho poměrně malý genom (157 Mb) s nízkým výskytem repetitivních sekvencí je organizován do pěti chromozomů a obsahuje přibližně 27 000 genů kódující proteiny (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Cheng *et al.*, 2017). Generační doba je krátká – kvetení nastává asi po 6 týdnech od vyklíčení a semena dozrávají nejpozději do 3 měsíců (Page *et Grossniklaus*, 2002). Díky svým vlastnostem se huseníček stal modelovým organismem ve výzkumech zaměřující se na jednoduché inzerční mutagenese, hybridizační křížení, transformace DNA či analýzu mutantů s rozdílným fenotypovým projevem (Meinke, 1998).

Na počátku 21. století se genetici a molekulární biologové soustředili na studium a pochopení molekulárního základu vývoje rostlin, identifikaci nově objevených genů, a to zejména u huseníčku rolního, první rostliny, jejíž genom byl v roce 2000 zcela osekvenován (Alonso *et Ecker*, 2006). Přes veškeré pokroky byly získané znalosti ohledně genů a jejich funkce stále omezené. Pro výzkum této problematiky byl iniciován projekt Arabidopsis 2010, jež měl za cíl do roku 2010 identifikovat funkce širokého množství genů. Pro usnadnění izolace nových genů vznikly alternativní metody využívající mutagenese či jiné molekulárně genetické postupy. Rozlišují se dva způsoby, které jsou schopny propojit danou sekvenci s funkcí specifického genu – dopřední (forward) a reverzní (Peters *et al.*, 2003).

3.5.1 Indukce mutací

Mutagenese patří mezi základní nástroje studia funkce genů. K indukci mutací se využívají techniky klasické mutagenese chemickými látkami (EMS) nebo působení krátkovlnného záření (rychlé neutrony, rentgenové záření, gama záření). Z biologických metod se nejčastěji používá transformace pomocí T-DNA nebo transpozonů. Biologické metody mutagenese nejsou vhodné pro analýzu velké mutantní populace kvůli své náročnosti ve srovnání s chemickými či radiačními činidly (Alonso *et Stepanova*, 2003).

Účinky alkylačního činidla EMS byly popsány v kapitole 3.1.1. Chemicky indukovaná mutagenese pomocí EMS vede ke vzniku náhodně distribuovaných mutací v celém genomu huseníčku a může být použita nejen pro vyhledávání mutantů se ztrátou nebo zisku genové funkce, ale i pro pochopení úlohy aminokyselinových zbytků a esenciálních genů. Frekvence výskytu mutací závisí na poloze genu v genomu a podmínkách působení léčiva během mutagenese. Účinky, jako jsou embryonální lethalita či chlorofylové mutace, souvisí s časovou délkou expozice EMS o definované koncentraci. (Kim *et al.*, 2006). Ve srovnání s mutagenesí ozáření indukuje EMS poměrně málo řetězových zlomů, které vedou k inverzním nebo delečním mutacím. Ačkoli tento mutagen může měnit DNA sekvence několika způsoby, jeden

z jeho nejběžnějších účinků je chemická modifikace guaninových bází v DNA vedoucí ke konverzi bázevého páru G/C na pár A/T. Změna v sekvenci genu, která zahrnuje pouze jeden pár bází, je známá jako bodová mutace. Tichá bodová mutace nezpůsobuje žádnou změnu v aminokyselinové sekvenci nebo aktivitě proteinu kódovaného genem. Pozorovatelné fenotypové důsledky způsobené změnami aktivity proteinu však mohou vzniknout z bodových mutací, které vedou k substituci jedné aminokyseliny za jinou (mutace s pozměňujícím účinkem), zavedení předčasného stop kodonu (nesmyslné mutace) nebo změně čtecího rámce genu. Jelikož změny indukované EMS vedou převážně k poklesu nebo ztrátě aktivity proteinu než ke zvýšení aktivity, mutagenese obvykle produkuje mnohem více recesivních mutací než dominantních (Lodish *et al.*, 2013).

3.5.2 Dopředná genetika

Dopředná genetika je metoda zkoumající nové geny a jejich funkci. Identifikuje sekvenční změny, jež mají za následek projev specifického mutantního fenotypu. Cílem metody je odhalit geny, které stojí za odlišným fenotypem v porovnání s fenotypem kontrolních rostlin (Page *et Grossniklaus*, 2002). V dopředné genetice jsou žádoucími faktory snadná reprodukovatelnost, citlivost a specifita (Alonso *et Ecker*, 2006).

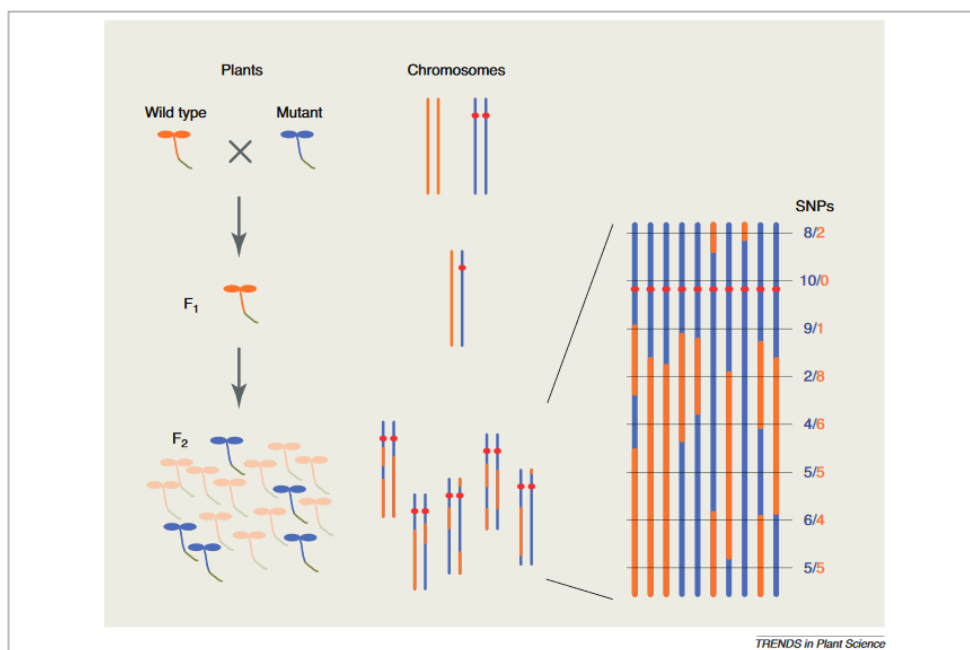
U huseníčku rolního slouží dopředná genetika ke studiu všech funkčních procesů. Jedním ze zkoumaných procesů byla identifikace mutantů exprimující gen jaderného chlorofylového a/b vazebného proteinu (CAB) v nepřítomnosti funkčních chloroplastů. Studie se zabývala mutací ovlivňující morfologické změny vyvolané ethylenem u sazenic pěstovaných ve tmě, kdy došlo k odhalení velkého počtu lézí, jež měly vliv na biosyntézu, vnímání a signalizaci vůči tomuto rostlinnému hormonu. Dále byla cyklická exprese CAB využita k vývoji citlivých molekulárních markerů pro studium biologických rytmů v rostlinách. Spojením promotoru CAB s reportérovým genem luciferázy bylo možné pozorovat cirkadiální oscilace v rostlinách, což umožnilo izolovat mutanty se změnou cirkadiálního rytmu (Alonso *et Ecker*, 2006).

Výchozím prvkem dopředné genetiky je mutagenizovaná populace rostlin či linie rostlin, které vykazují určitou fenotypickou variabilitu. Rostliny se mohou od kontrolního organismu (tzv. pozadí) lišit např. tvarem listů, odlišným časovým obdobím růstu, morfologií embrya či letalitou při vysazení. Pro studium určitého fenotypu je nutné zjistit počet genů, jež se na mutantním fenotypu podílí, o jaký typ mutace se jedná a jaké jsou vztahy alel. K tomu slouží genetické analýzy, jako jsou testy na alelismus, segreganční analýzy, analýzy reciprokého křížení a genetické mapování.

Dopředná genetika doposud patří mezi nejvyužívanější strategie, které mají za cíl charakterizování genů a jejich funkcí. Před vývojem sekvenačních technologií NGS (next generation sequencing) začínala identifikace variabilních sekvencí způsobujících mutantní

fenotypy vždy mapováním celého genomu pomocí malého množství markerů, následovala přesnější mapováním menších sekvencí a identifikací kauzální mutace sekvenováním kandidátních genů. Tento náročný postup byl brzy nahrazen efektivní metodou zvanou SHORE mapování (SHOREmap), při níž dochází k resekvenování celého genomu a k hromadné segreganční analýze. Výhodou této metody je, že využívá mutace, které se indukují např. chemickým činidlem a již není třeba rostliny křížit s geneticky odlišnou linií, což často vedlo k zeslabení či ztrátě fenotypu. (Galvão *et al.*, 2012; Schneeberger *et al.*, 2009).

V experimentech se uplatňuje mutagenizovaná populace (např. pomocí EMS), ve které je zastoupena část populace recesivními mutanty huseníčku rolního. Tato populace vykazuje odlišné fenotypové vlastnosti – slabý růst a světle zelené listy, patrně způsobené výskytem léze v neznámém genu (Schneeberger *et al.*, 2009). Mutantní rostliny se kříží s nemutantní rostlinou a následná generace se samospraší. Potomci druhého křížení vytvářejí rekombinantní F₂ populaci se segregujícím mutantním fenotypem. Jedinci, kteří vykazují mutantní fenotypy, mohou být izolováni, sdruženi a sekvenováni. Mapování pomocí sekvenování pak odhaduje alelické frekvence rodičovských alel v celém genomu a je určena chromozomální oblast, která obsahuje požadovanou mutaci. Při samotné identifikaci kauzální mutace se stanovuje seznam kandidátních genů či mutací a určuje se, co způsobuje daný fenotyp prostřednictvím fenokopie a komplementačních testů (Doitsidou *et al.*, 2016). Princip SHOREmap je znázorněn na Obrázek 3.



Obrázek 3: Diagram SHORE mapování

V SHORE mapování dochází k segregaci mutantního fenotypu. Červená barva znázorňuje kauzální mutaci způsobující mutantní fenotyp (Schneeberger *et Weigel*, 2011)

Mapování pomocí sekvenování, využívající se v SHOREmap se tedy opírá o polymorfní markery mezi dvěma rodičovskými alelami. Dokáže analyzovat různé typy segregujících mapovacích

populací odvozených od „outcrossing“ mutantů (křížení mezi dvěma nepříbuznými liniemi) nebo zpětného křížení mutanta s jeho progenitorem. Díky outcrossingu vzniká velký počet přirozených polymorfismů, jež jsou odhaleny porovnáním alelových frekvencí. V mapovací populaci generované zpětným křížením mutanta s nemutagenizovaným progenitorem je mutantní fenotyp segregován (Sun *et al.* Schneeberger, 2015).

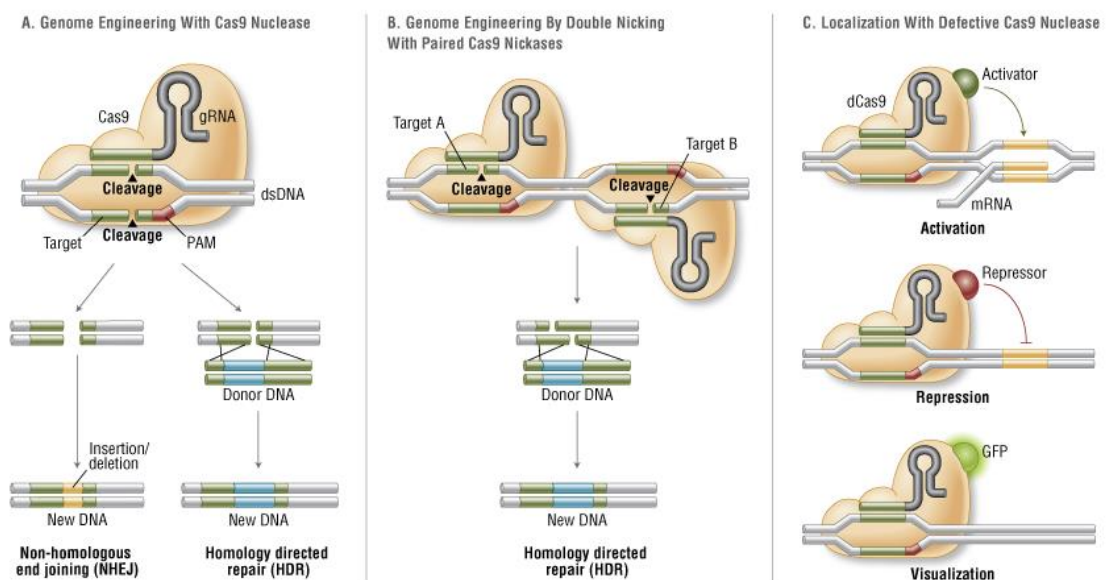
3.5.3 Reverzní genetika

Reverzní genetika využívá znalosti zájmového genu a snaží se určit dopady jeho změn na fenotyp. Při této metodě se tedy nehledají geny podmiňující daný fenotyp, ale analyzují se procesy, v nichž jsou uplatněny genové produkty (Moresco *et al.*, 2013). K získání mutací využívá metody T-DNA inzerční mutagenese. Pro analýzu genové sekvence se používá i náhrada genu homologní rekombinací, avšak z důvodu nízké efektivity není vhodná pro analýzu genů v širokém měřítku (Maes *et al.*, 1999). Pro inzerční mutagenesi je nutné určit, zda došlo k začlenění inzertu do daného genu a tím k jeho vyřazení. Pro selekci a skríníng byly vyvinuty specializované genové vektory.

Mezi metody reverzní genetiky se řadí analýzy využívající umlčování genů pomocí dvouvláknové RNA a je označována jako RNA interference (RNAi). Díky RNAi lze cíleně umlčet gen zájmu na úrovni transkriptu, vytváří specifický knockout efekt, aniž by skutečně mutovala požadovanou DNA (Bayou, 2017). Přesto, že RNAi byla vyvinuta jako obrana proti virům a retroelementům, v současné době našla uplatnění ve studiu genové funkce. Umlčení genů předchází zavedení dsRNA do buněk, kde se zpracovávají pomocí RNAs na malé interferující RNA, dlouhé 20–26 nukleotidů (siRNA). Jeden ze dvou řetězců siRNA je inkorporován do komplexu umlčované RNA. Výsledkem je specifická inhibice genové exprese na úrovni transkripce nebo translace (Zhai *et al.*, 2009).

Nejnovější technika reverzní genetiky CRISPR/Cas9 (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindrom, Cas9, CRISPR-associated protein 9) umožňuje editovat sekvence prakticky v každém organismu. Využívá segmenty, jež jsou pravidelně rozmístěny na krátkých palindromických repeticích (krátké úseky prokaryotické DNA obsahující krátké repetice nukleotidů) a asociovaných proteinů. Enzymatický komplex CRISPR/Cas9 se navazuje na určité místo v DNA, kde vystříhne část sekvence a prázdné místo nahradí jinou sekvencí (Hsu *et al.*, 2014). Definované místo, jež je vystřiženo nukleázou Cas9, vyhledává navádějící crRNA. Aby bylo dosaženo specifického rozpoznání a štěpení DNA, Cas9 tvoří komplex jak s crRNA, tak s tracrRNA (transaktivační CRISPR RNA). TracrRNA je nutná pro maturaci z primárního transkriptu kódující pre-crRNA. Funkce Cas9 závisí na přítomnosti dvou nukleázových domén – RuvC nacházející se na aminovém konci a doméně HNH, jež je lokalizovaná ve střední oblasti proteinu. Během destrukce cílové DNA nukleázové domény štěpí obě vlákna DNA a vytváří DSB

v místech určených asociované crRNA. Doména HNH štěpí komplementární řetězec, zatímco RuvC doména štěpí nekomplementární řetězec (Jiang *et Doudna*, 2017). Pro editaci genomu byly doposud použity tři varianty Cas9 nukleázy. První z nich, wild type varianta, štěpí specificky dvouvláknovou DNA, což má za následek aktivaci mechanismu opravy DSB, jež jsou opravovány NHEJ nebo HR. Cong a kolektiv (2013) vyvinuli mutantní formu, známou jako Cas9D10A, jež štěpí pouze jedno vlákno DNA, neaktivuje tak NHEJ a uplatňuje se pouze cesta HR. Třetí varianta Cas9 obsahuje mutaci v doméně HNH a v doméně RuvC inaktivují aktivitu štěpení, avšak nebrání vazbě na DNA. Používá se pro specifické cílení na sekvence bez toho, aniž by došlo ke štěpení, avšak má schopnost umlčet či aktivovat geny (Sander *et Joung*, 2014). Jednotlivé typy Cas9 jsou znázorněny a popsány na Obrázek 4.



Obrázek 4: Tři varianty Cas9 nukleázy

(A) wild type Cas9 štěpí dvouvláknové DNA a tím aktivuje opravu dvouvláknových zlomů pomocí nehomologního spojování konců (NHEJ) nebo homologní rekombinací (HR); (B) Mutantní forma Cas9 jež způsobuje zlom pouze na jednom vláknu, tudíž neaktivuje opravnou cestu NHEJ ale pouze HR; (C) Cas9 postrádá nukleázovou aktivitu, využívá specifické cílení sekvence a může být použita pro aktivaci, represi či vizualizaci genu (Sander *et Joung*, 2014).

Technika CRISPR/CAS9 umožňuje s vysokou účinností vnášet úseky cizí DNA, nebo akcelarovat jednotlivé geny. Objasňuje funkční uspořádání genomu na úrovni systémů a nachází spojení s kauzálními variacemi a biologickými fenotypy. Využití našla rovněž v transkripčních a epigenetických modifikacích nebo dokonce v buněčné terapii (Zhang *et al.*, 2018).

3.6 Hlavní úloha projektu

Pro identifikaci genů podílejících se na opravě DNA-proteinových komplexů byly použity fenotypy rostliny huseničku, které vykazovaly citlivost vůči zebularinu. Zebularin je stabilní analog cytidinu, jenž je schopen se začlenit do RNA i DNA a vede ke ztrátě metylace, jež je zodpovědná za replikaci, rekombinaci, buněčnou expresi či diferenciaci a opravu DNA. Ztráta některých z metyltransferáz může být až letální. Na rozdíl od savců, kde se metylace DNA obnovuje, je metylace u rostlinné DNA přenášena po celou dobu vývoje. Aplikací zebularinu dochází ke kovalentnímu spojení s DNMTs a vytvoření DNMT-DNA proteinového crosslinku (Lim *et al.*, 2011). Produkt představuje fyzickou bariéru pro polymerázy a je rozpoznán jako poškození vyžadující opravu. Zebularin do jisté míry interferuje s chromatinovou strukturou a způsobuje nežádoucí účinky, jako je snížení schopnosti růstu rostlin (Liu *et al.*, 2015).

Molekulární a genetické výsledky naznačují, že k poškozením indukovaným zebularinem dochází během replikace. Opravné mechanismy jsou regulovány DNA DEPENDENTNÍMI PROTEIN KINÁZAMI (DNA-PKcs) - ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED (ATM) a ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED A RAD3-RELATED (ATR), které jsou nezbytné pro rozpoznání poškození DNA. Dle dosavadních výzkumů bylo zjištěno, že ATM se uplatňuje při opravách na dvouvláknových zlomech DNA, zatímco ATR je přítomna při opravách poškození, kdy dochází ke vzniku jednořetězcové DNA, především na replikačních vidličkách v průběhu replikace (Cimprich *et Cortez*, 2008; Liu *et al.*, 2015). ATM a ATR kinázy fosforylují proteiny obsahující serinové (Ser) nebo threoninové (Thr) zbytky, které jsou následovány glutaminem (Gln), tyto proteiny tvoří tzv. SQ a TQ motivy (Bakkenist *et Kastan*, 2004). Kinázy jsou během opravy schopny iniciovat složité změny v lokální struktuře chromatinu poblíž místa poškození (Zhou *et Elledge*, 2000) a aktivovat tak další efekторы podílejících se na opravě DNA (Cimprich *et Cortez*, 2008). Reparace rovněž vyžadovala funkční komplex SMC5/6 (Structural maintenance of chromosomes 5/6), neboť ztráta jednoho z jeho jadrových prvků vede k přecitlivělosti na zebularin (Liu *et al.*, 2015).

Výzkum zaměřující se na opravný mechanismus DNA-proteinových komplexů by mohl nalézt efektivnější využití léků při léčbě různých typů onemocnění, zejména nádorů. Z toho důvodu je nezbytné pochopení všech funkčních mechanismů, ale i identifikace genů, které se podílejí na opravách.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro identifikaci genů podílejících se na opravách DNA-proteinových komplexů byly použity linie rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), které jsou shrnuty v Tabulka 1. Semena těchto linií byla skladována ve 2ml zkumavkách se šroubovacím víčkem v lednici při teplotě 4 °C.

Tabulka 1: Seznam rostlinných linií

Název	Popis linie	Původ
W-35	Col-0 wild type	Pecinka group
W-35 mutagenizovaná M ₂ populace	Col-0 mutagenizovaná EMS	Pecinka group
<i>smc6b-1</i>	Col-0 pDOK2 T-DNA inserce, chromozom 5 pos. 8 234 555 bp; AT5G61460	SALK_101968C

Podmínky pro růst rostlin byly odlišné pro různé fáze experimentu. Sterilizovaná semena byla vysévána na 1/2 Murashige a Skoog médium (MS) a inkubována ve fytotronu. Po sedmi dnech v růstové komoře měly rostliny dostatečně dlouhý kořen na to, aby se zasadily do zeminy. Zemina byla ošetřena přípravkem Careo a smíchána s perlitem v poměru 3:1. Vysazené rostliny rostly 3 týdny ve fytotronu a poté se přemístily do skleníku. Přesně definované růstové podmínky jsou shrnuty v Tabulka 2.

Tabulka 2: Růstové podmínky

Místnost	Použití	Podmínky		Účel
Fytotron	Petriho misky s růstovým médiem pro vyklíčení semen, rostliny zaseté v zemině s perlitem jejichž stáří je do 1 měsíce	Den	Noc	Analýza vyklíčených semen dle velikosti kořínků, růst rostlin, dozrávání šešulí při hybridizačním křížení
		16 hod 19 °C vlhkost 65 %	8 hod 18 °C vlhkost 65 %	
Skleník	Rostliny zaseté v zemině s perlitem obvykle starší než 1 měsíc	16 hod 24 °C	8 hod 16 °C	Růst rostlin za účelem dozrávání jejich šešulí

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, kat.č. R0611)
- Agar (HiMedia, kat.č. RM201)
- DEPC ošetřená voda (diethyl-dikarbonát) (Sigma-Aldrich, kat. č. 159220)
- DMSO (dimetyl sulfoxid) (Serva, kat.č. 39757)
- EDTA (kyselina ehylendiamintetraoctová) (Sigma-Aldrich, kat.č. E5134)
- Ethylalkohol 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)
- Isopropylalkohol 99% p.a. (Lach-ner, kat. č. 20037-AT0)
- MS směs (Duchefa Biochemie, kat.č. M0231)
- PCR agaróza (Top-Bio, kat.č. P045)
- PCR ethidium bromid (Top-Bio, kat.č. P047)
- Sacharóza p.a. (Lach-ner, kat.č. 40135-AP0)
- Tris (Sigma-Aldrich, kat.č. T1503)
- Triton X-100 (t-oktylfenoxypolyethoxyethanol) (Sigma-Aldrich, kat.č. 9002-93-1)
- Trizol (Thermo-Fischer Scientific, kaat. č. 15596026)
- Tween20 (Sigma-Aldrich, kat. č. 9005-64-5)
- Zebularin 10 μ M v DMSO (1- β -D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-on) (Sigma-Aldrich, kat.č. 3690-10-6)

Použité soupravy

- DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, kat. č. 69106)
- Phusion High-Fidelity PCR Kit (Thermo Fischer Scientific, kat. č. F553S)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, kat.č. 27104)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, kat.č. 28704)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, kač. č. 04379012001)

Použité oligonukleotidy

Návrhy sekvencí oligonukleotidů byly vyhotoveny manuálně v programu Geneious verze 11.1.4. Některé sekvence oligonukleotidů byly převzaty z diplomové práce Karin Krusky (Kruska, 2017), na jejíž práci tento výzkum navazoval. Oligonukleotidy byly dodány od firmy Eurofins. Sekvence použitých oligonukleotidy jsou uvedeny v Tabulka 3.

Tabulka 3: Oligonukleotidy použité pro PCR amplifikaci a Sangerovo sekvenování

Název	Sekvence 5'→3'	PCR produkt [bp]	Účel
smc6b_PCR1fw	CCCTAAGCAGTCGCATCAAT	A 887	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_A1rs	GCAGACTCAGTTATCCT		
smc6b_PCR_seq2fw	ATTTGGATGTCGAGCGAGAG	B 1249	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_1rs	CCAAATTTTCGGATGAAGGAA		
smc6b_PCR_seq2fw	ATTTGGATGTCGAGCGAGAG	C 758	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_seq2rs	CCACACACGGATTTTCAACA		
smc6b_PCR_2fw	AATGTGAGTTTTGGCCGTTT	D 2320	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_2rs	GAGCCTTGCAGCCCATTTC		
smc6b_PCR_seq4fw	TCGAGCTCAGACTGGTTGATT	E 1389	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_2rs	TTACCACATGGGAGCCAATAG		
smc6b_PCR_B3fw	GGCTGAACAATCTGAAATCGAGG	F 1446	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_C1rs	ATATAGCGGGATTGTCCATGCC		
smc6b_PCR_3fw	ACATGCTCACCAGGTTACTGC	G 1731	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_exon17rs	TGCTTCGATCTCAGCAGCGA		
smc6b_PCR_seq7fw	GAGAGCATCTAAGGGATATAGGA	H 1394	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_3rs	CCCTGGGCAATAATAACCTACA		
smc6b_PCR_exon16fw	CATGAGACGTAAGAGGGAGGC	I 1191	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_3rs	CCCTGGGCAATAATAACCTACA		
smc6b_PCR_4fw	CCAGTTTGAAACCCGGTATG	J 1580	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_4rs	TGGGTCATGCAAGCAAAT		
smc6b_PCR_seq10fw	GGCAGTAAGAGTCGCTTTCC	K 936	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_4rs	TGGGTCATGCAAGCAAAT		
smc6b_PCR_seq11fw	TTGGAGAAGGATCGCAGTGG	L 662	Amplifikace gDNA
smc6b_PCR_seq11fw	ATGGACATTTCTTAATCCGAAGC		
smc6b_PCR_C3fw	CGCTAGTATCCATAACCGTT		Sekvenování

Oligonukleotidy, které jsou uvedeny pro amplifikaci genomické DNA, byly použity rovněž na Sangerovo sekvenování. Jediný oligonukleotid, který sloužil pouze k dodatečnému sekvenování produktu byl oligonukleotid smc6b_PCR_C3fw.

Použité roztoky a jejich příprava

Agaróзовé médium pro fotodokumentaci: Rozpustit 3 g agarózy v 300 ml destilované vody. Roztok nechat rozvařit v mikrovlnné troubě, dokud nebude zcela čirý. Po 10 ml rozlévat namíchaný roztok na Petriho misky.

Agaróзовý gel pro elektroforézu: Pro přípravu 1% agaróзовého gelu navážit 1 g agarózy a smíchat s 100 ml TAE pufru. Roztok rozvařit v mikrovlnné troubě, dokud nebude zcela čirý. Rozvařený roztok nechat chvíli vychladnout, přidat 4 μl ethidium bromidu a nalít do elektroforetické komůrky. Do komůrky s 1% agaróзовým roztokem vložit elektroforetický hřebínek a nechat roztok zatuhnout.

Hypochlorid sodný 8%: Smíchat 7 ml 12% NaClO s 3 ml destilované vody. Pomocí automatické pipety přidat 100 μl 20% detergentu Tween20.

1/2 Murashige a Skoog médium (pH 5,8): Smíchat 22 g MS soli obsahující makro a mikro elementy (Duchefa M0231), 10 g sacharózy, 1 g MES a 6 g agaru. Doplnit do objemu 1 l destilovanou vodou. Upravit pH na 5,8 pomocí přídatku KOH. Tento roztok nechat vyautoklávovat. Pro analýzu délky kořínků přidat do předehřátého média 7,5 μM nebo 20 μM zebularin dle potřeby experimentu.

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

Použité přístroje

- 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)
- 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)
- Sekvenátor 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)
- 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)
- Zpracování a analýza snímků – program Image J (Java) a Adobe Photoshop CS5 (Adobe)
- Zpracování struktury genů, navrhování sekvencí primerů – program Geneious (11.1.4.)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Sterilizace semen

Před vysázením semen na kultivační Petriho misky s růstovým médiem se musela semena podrobit sterilizaci zabraňující vzniku kontaminací na růstovém médiu. Vysušená semena se vložila do 1,5ml mikrozkušavky. Samotná sterilizace probíhala již v laminárním boxu. Nejprve se promyla 70% ethanolem po dobu 5 min při pokojové teplotě. Následně se nechala inkubovat 10 min v 8% hypochloridu sodném s 1% Tween20. Po několikerém promytí sterilní vodou se do zkumavky k semenům přidala 0,1% agaróza, která umožňovala díky své konzistenci snadnější vysévání na růstové médium. Vysterilizovaná semena se uložila do lednice o teplotě 4 °C, kde se uchovala po dobu 24–48 hod, čímž došlo k synchronizaci klíčení.

4.4.2 Genetický skrínink

Pro genetický screen byly použity semena linie W-35 (Col-0) mutagenizovaná alkylačním činidlem EMS, které způsobuje ethylaci v pozici N⁷- nebo O⁶- na guaninu. V DNA se mutace projevují jako záměny bází G na A, pokud ke změně došlo ve Watsonově řetězci, nebo jako C na T, pokud změna proběhla na Crickově řetězci.

Celkem bylo mutagenizováno přibližně 10 000 semen (M₀), tato semena byla následně zaseta do půdy a sloužila k další reprodukci a získání semen M₂ generace. Bylo sesbíráno celkem 108 skupin semen M₂ – o tuto část práce se zasloužil Dr. Andreas Finke (Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Colegne, Německo). Pro mou analýzu v rámci bakalářské práce byly vybrány tři skupiny sesbíraných semen M₂, označené jako 9A, 9B a 10A. Z každé této skupiny bylo vyseto přibližně 1200 semen na Petriho misky obsahující 1/2 MS médium s přídavkem 7,5 μM zebularinu, díky čemuž bylo možné selektovat rostliny, které byly senzitivní vůči zebularinu. Senzitivita na zebularin se u vyklíčených rostlin projevovala krátkou délkou kořínků. Všechny rostliny mající krátký kořínek a vykazující zpomalený růst, byly selektovány a přeneseny na 0,6% 1/2 MS médium, které již neobsahovalo zebularin. Na tomto médiu rostliny M₂ dorostly do potřebné délky, poté se zasadily do zeminy a sloužily k získání další generace semen M₃ na kterých bylo prováděno další testování.

4.4.3 Analýza délky kořínků

Vysterilizovaná semena, která prošla genetickým screenem, byla inkubovaná 1-2 dny při teplotě 4 °C. Následně se vysévala na Petriho misky obsahující 1/2 MS médium (kontrolní médium) a na Petriho misky obsahující 1/2 MS médium s přídavkem 20 μM zebularinu. Petriho misky s vysetými semeny se následně uložily do fytotronu. Semena se zde inkubovala po dobu 7 dní. Následovala analýza kořínků, kdy se vybrané senzitivní linie rostlin, jež prokazovaly citlivost vůči zebularinu, přenesly na agarové médium, přičemž došlo k narovnání kořínků a zhodnocení jejich délky. Takto seřazené rostliny byly vyfotografovány. Pomocí programu Image J a interní

kontroly fotografované při stejném zvětšení se stanovila přesná délka kořínků u každé senzitivní linie rostlin. Na základě těchto údajů došlo k vypočítání průměrné délky kořínků v kontrolním médiu a v médiu se zebularinem. Tento průměr vycházel přibližně ze 100 rostlin. Zásadním výstupem pro tuto analýzu byl však poměr mezi těmito dvěma průměry, který sloužil k porovnávání zkoumaných linií.

4.4.4 Hybridizační křížení

Huseníček rolní patří mezi samosprašné rostliny. Aby se zabránilo sprášení vlastními pylovými zrny při hybridizačním křížení, musely květy rostlin podstoupit odstranění tyčinek. Emaskulace se prováděla u nejstarších pupenů, které ještě nezačaly kvést a jejichž prašníky měly lehce nažloutlou či zelenou barvu. Bylo však důležité při tomto procesu neponičit pestík květu. Rostliny s odstraněnými tyčinkami se uložily do fytotronu. Za 1–2 dny po emaskulaci došlo opylování pylovými zrny z jiné linie huseníčku rolního. Rostliny rostly ve fytotromu za stabilních podmínek po dalších 21 dnů než došlo k dozrání šešulí nesoucí hybridní semena. Tyto zralé šešule bylo nutné opatrně odebrat tak, aby nedošlo ke kontaminaci jinými šešulemi s nehybridními semeny.

4.4.5 Mapovací populace

Mapování populace se provádělo u kandidátních linií, které byly citlivé vůči zebularinu, avšak nejednalo se u nich o mutace ve známém genu *SMC6B*. Tyto kandidátní linie byly kříženy s wild type (WT) linií – W35, která je vůči zebularinu rezistentní. Vzniklé hybridní rostliny se již nepodrobovaly žádnému hybridizačnímu křížení, ale nechaly se přirozeně samosprašit, čímž došlo k získání hybridních semen F_2 generace. Právě v F_2 generaci se prováděl výběr rostlin pro genetické mapování. Semena se opět podrobila analýze na médiu s přídatkem 20 μ M zebularinu. Přibližně ze 400 vyklíčených rostlin byli vybráni jen ti jedinci, kteří vykazovali citlivost vůči zebularinu. Segregace pro recesivní citlivý fenotyp by měla vycházet dle mendelovských zákonitostí v poměru 1:3.

4.4.6 Izolace DNA

Pro izolaci DNA byl použit postup DNeasy Plant Mini Kit dle instrukcí výrobce. DNA se získávala z rostlin starých 7 dní. Ideální navážka rostlin by měla činit 100 mg. Rostliny se vložily do 2 ml zkumavky opatřené zámkem se třemi skleněnými kuličkami o průměru 2 mm. Zkumavky se zamrazily se pomocí tekutého dusíku. Následně se homogenizovaly pomocí Tissue Raptoru po dobu 1 min. Vzniklý prášek se přenesl do nové zkumavky, kde se smíchal s 300 μ l pufru PL2 a 10 μ l RNA A. Po inkubaci 10 min na thermobloku o teplotě 65 °C se ke směsi přidalo 75 μ l pufru PL3. Vzorek bylo nutné poté inkubovat na ledu po dobu 5 min. Zbylé kroky probíhaly již standardním postupem dle protokolu výrobce. Na konci izolace byla zjištěna koncentrace vyizolované gDNA pomocí Nanodropu.

4.4.7 Izolace RNA a syntéza cDNA

RNA se izolovala z rostlin starých 7 dní, stejně jako tomu bylo u izolace DNA. Veškerá práce musela probíhat sterilně v laminárním boxu určenému pro izolaci RNA. Použité zkumavky a skleněné kuličky byly ošetřeny vůči enzymu RNase, který by izolovanou RNA degradoval. Všechny centrifugace, které jsou v procesu izolace RNA zahrnuty, probíhaly při otáčkách 13000 rpm a teplotě 4 °C. Lišily se pouze v čase.

Rostliny se vložily do 2ml zkumavek se zámkem a třemi skleněnými kuličkami o průměru 2 mm. Zkumavky se zamrazily tekutým dusíkem. Homogenizace se prováděla 1 min na Tissue Raptoru. Do zamrazeného vzorku ve zkumavce se pomocí automatické pipety přenesl 1 ml Trizolu, který deaktivoval RNasy. Vzorek byl zvortexován a následně inkubován 10 min při pokojové teplotě. Po ukončení inkubace byl vzorek 10 min centrifugován. Oddělený supernatant se přenesl do nové zkumavky a smíchal se s 200 µl 100% chloroformu. Obsah zkumavky bylo nutné promíchat ručně protřepáním a inkubovat 3 min. Pro oddělení fází se použila 15 min centrifugace. Oddělená vrchní vodní fáze se přenesla do nové zkumavky. Po přidání 500 µl 100% isopropanolu byl roztok inkubován 10 min a 10 min centrifugován. Odstranil se supernatant a zbylý sediment se rozpustil v 1 ml 75% ethanolu, který byl připraven ředěním s DEPC ošetřenou vodou. Vzorek byl zvortexován a 5 min centrifugován. Supernatant se vylil a zbylý sediment se sušil 15 min při pokojové teplotě. Pelet obsahující RNA se rozpustil ve 40 µl v DEPC vodě. Zkumavka byla vložena do termobloku předehřátého na 55 °C, kde se vzorek inkuboval po dobu 10 min. Po ukončení inkubace byla proměřena koncentrace RNA a vzorek bylo možné uskladnit. Pro syntézu cDNA byl použit Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis a postupovalo se dle instrukcí výrobce.

4.4.8 Stanovení koncentrace nukleových kyselin

Pro jakoukoliv další laboratorní práci s izolovanými nukleovými kyselinami bylo nutné znát jejich koncentraci v roztoku. Pro stanovení koncentrace DNA a RNA byl použit spektrofotometr Nanodrop. Na Nanodrop se nanášel vzorek izolované nukleové kyseliny pomocí automatické pipety. Přenesený objem činil 1 µl vzorku. Absorbance se měřila při vlnové délce 260 a 280 nm.

4.4.9 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je metoda sloužící k amplifikaci úseků DNA. Základem reakce je reakční směs, která se skládá z 5x PCR pufru, DNA, primerů (forward a reverse), polymerázy Phusion, 2mM dNTPS a vody. PCR amplifikace probíhá v přístroji thermo-cycler, který umožňuje volit teploty dílčích reakcí, délky jednotlivých fází a opakování cyklů. Klasická PCR lze rozdělit do tří základních fází – denaturace nukleových kyselin, nasedání primerů a prodlužování.

Pro PCR amplifikaci byly použity reakční směsi o objemu 20 μl či 50 μl . Objemy použitých látek jsou shrnuty v Tabulka 4. Denaturace probíhala za velmi vysokých teplot a to při 98 $^{\circ}\text{C}$. Teplota nasedání primerů byla dána teplotou tání, která byla specifická pro každý primerový pár. Avšak při použití více druhů primerů byla stanovena a použita průměrná teplota primerů. Prodlužovací fáze probíhala při teplotě 72 $^{\circ}\text{C}$, což je optimální teplota pro aktivitu PCR polymerázy. Po závěrečné elongaci docházelo k ochlazení reakce na 4 $^{\circ}\text{C}$. Délky cyklů, teploty a opakování jsou popsány v **Tabulka 5**.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci

Látka	Objem 20 μl	Objem 50 μl
5x PCR pufr	4 μl	10 μl
DNA, cDNA	1 μl	2,5 μl
Primer forward	2 μl	5 μl
Primer reverse	2 μl	5 μl
Polymeráza Phusion	0,75 μl	1,15 μl
2 mM dNTPs	2 μl	5 μl
H ₂ O	8,25 μl	21,35 μl

Tabulka 5: Podmínky PCR reakce

Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	4 min	1
PCR amplifikace	98	20–60 s	37
	průměrná teplota tání	20-60 s	
	72	2 min	
Závěrečná elongace	72	3 min	1

4.4.10 Gelová elektroforéza na agarózovém gelu

Elektroforéza patří mezi analytické separační metody. Jejím principem je rozdělení látek na základě jejich relativní molekulové hmotnosti pomocí stejnosměrného elektrického proudu. Molekuly se pohybují v agarózovém gelu, který funguje jako trojrozměrné síto. Dochází k postupnému rozdělení jednotlivých částic podle jejich velikosti. Menší molekuly projdou gelem rychleji než molekuly s větší velikostí. Elektroforéza byla použita pro stanovení úspěšnosti PCR amplifikace a ověření velikosti PCR produktů. Pro separaci byla využita kontinuální horizontální elektroforéza, jejíž gel obsahoval 1% agarózy, 1x TAE pufr a přídavek 0,5 μl . ml^{-1} ethidium bromidu (EtBr). Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě pod napětím 90 V. Pro orientační stanovení velikosti fragmentů DNA byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Vizualizace produktů byla zprostředkována pomocí UV transiluminátoru.

4.4.11 Sekvenování gDNA

Sangerovo sekvenování umožňuje určení pořadí nukleotidů v molekule DNA. V této metodě dochází opakovaně k syntéze řetězce podle templátu, avšak při každém opakování se syntéza přeruší přidáním modifikované nukleotidové bázi dideoxynukleotidu (ddNTP). Tato báze již nedovolí DNA polymeráze pokračovat v syntéze vlákna. Sangerovo sekvenování bylo provedeno laboratorní pracovníci na Ústavu experimentální botaniky v Olomouci. Délka čtených úseků dosahovala 700–800 bp.

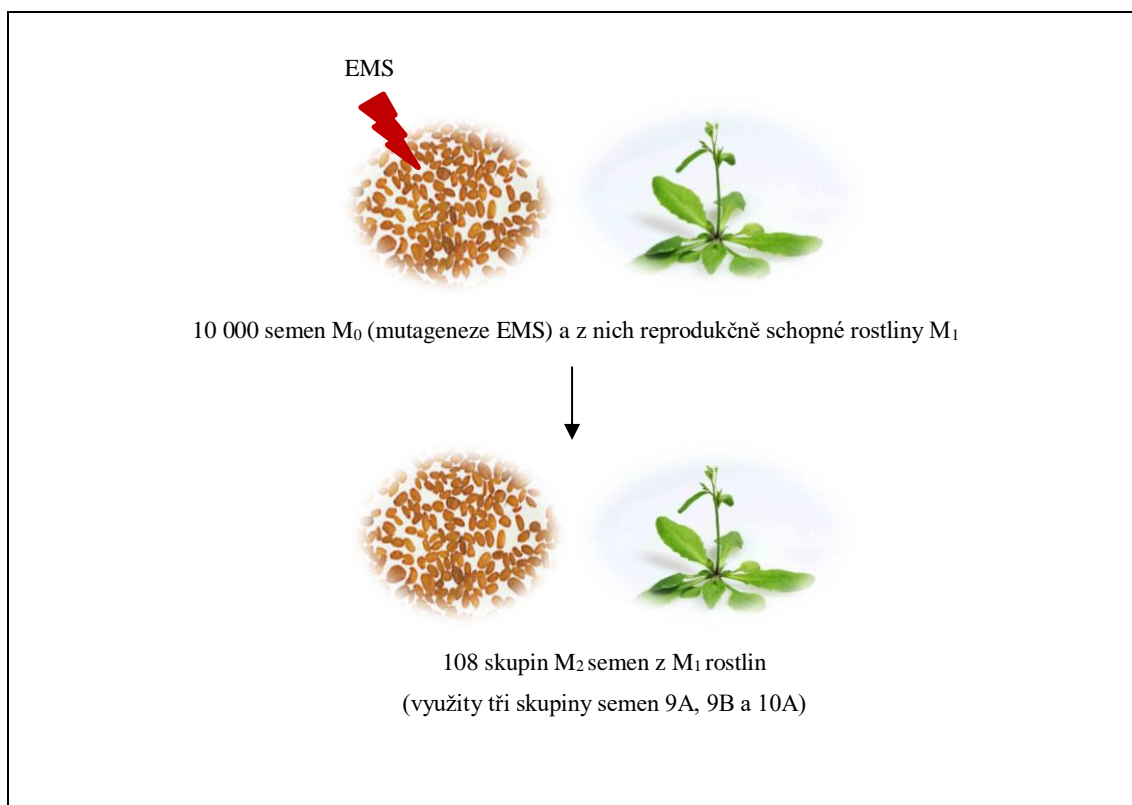
Dále bylo sekvenování vyhotoveno firmou MacroGen a SEQMe. Pro toto sekvenování bylo nutné zakoncentrovat PCR produkt pomocí centrifugačního evaporátoru na koncentraci pohybující se kolem 50 ng/μl. Jedna sekvenační reakce vyžadovala smíchání 5 μl zakoncentrovaného purifikovaného PCR produktu s 5 μl určitého primeru o koncentraci 10 pmol/μl. Takto připravené vzorky byly následně odeslány na sekvenování do výše zmiňovaných firem.

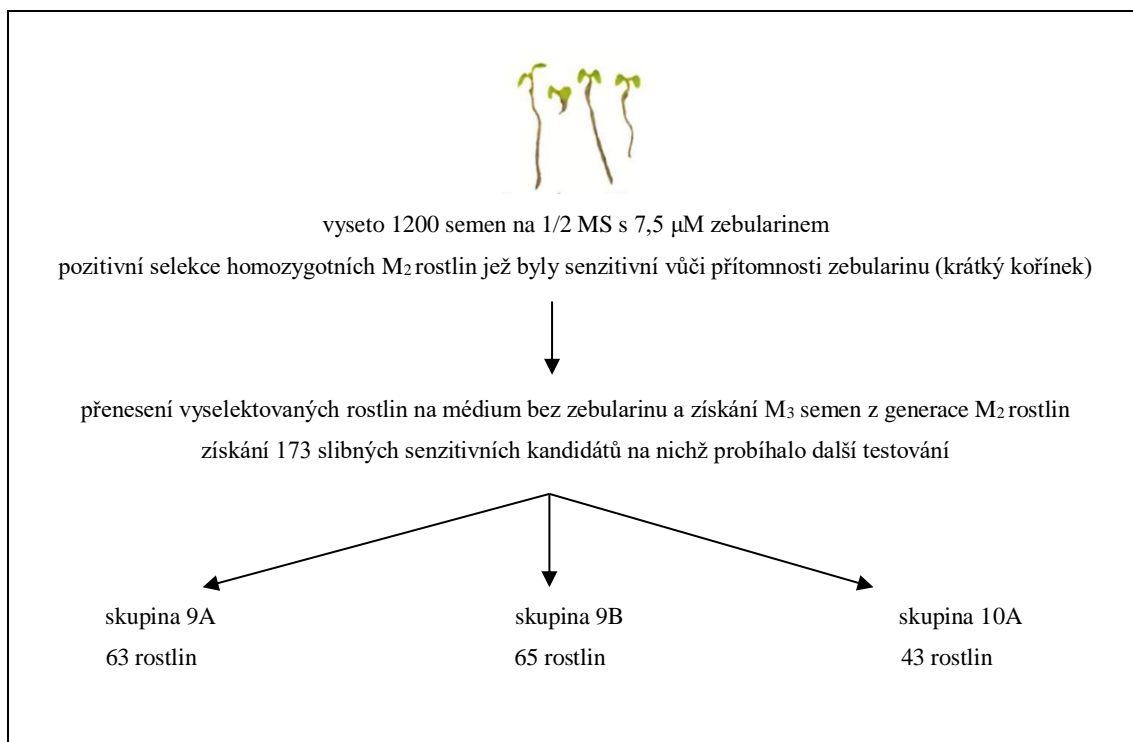
5 VÝSLEDKY

5.1 Selektivní skrínink citlivých kandidátů

Činidlem EMS bylo mutagenizováno přibližně 10 000 M_0 semen. Tato mutagenizovaná semena se zasela do půdy za účelem jejich vyklíčení a získání reprodukčně schopných rostlin (M_1). Během jejich generativního vývoje došlo u těchto rostlin k samosprášení a jejich semena (M_2) byla sesbírána po skupinách (batches). Celkem se sesbíralo 108 skupin, z nichž tři skupiny (9A, 9B a 10A) byly použity pro můj výzkum v rámci bakalářské práce. Podrobily se selektivní analýze testující jejich senzitivitu vůči zebularinu, která byla pro výběr rozhodující. Z každé této skupiny bylo vyseto přibližně 1200 semínek na Petriho misky obsahující 1/2 MS médium s přídavkem 7,5 μ M zebularinu. Po týdnu od jejich vysetí se mezi vyklíčenými rostlinami projevil značný rozdíl v délce rostoucích kořínků. Všechny rostliny s malým kořínkem byly selektovány a přeneseny na 0,6% 1/2 MS médium, které již neobsahovalo zebularin. Rostliny a jejich kořínky dorostly do potřebné délky a poté se zasadily do zeminy.

Z každé vybrané skupiny bylo takto selektováno přibližně 80 rostlin, avšak 20 % z nich uhynulo po přenesení do média či zeminy, jelikož účinky zebularinu byly pro ně fatální. Celkem přežilo 63 rostlin ze skupiny 9A, 65 rostlin ze skupiny 9B a ze skupiny 10A 43 rostlin, jejichž semena (M_3) se poté sesbírala a podrobila dalším analýzám. Sbírký semen byly značeny dle rostlin – pokud se jednalo o semena z první rostliny pocházející ze skupiny 9A, získala tato sbírka semen označení 9A-1 atd. Schématické znázornění selekce je možné vidět na Obrázek 5.





Obrázek 5: Schématické znázornění selekce senzitivních M₃ rostlin huseníčku rolního na zebularin

Z EMS mutagenizovaných semen M₀ vyrostly reprodukčně schopné M₁ rostliny produkující semena M₂. Tato M₂ semena byla sesbírána a rozdělena do 108 skupin, z nichž na třech skupinách (9A, 9B a 10A) byla prováděna selekce na základě senzitivity vůči 7,5 µM zebularinu obsaženého v 1/2 MS médiu. Senzitivita se projevila krátkou délkou kořínku po týdnu od vysetí semen (M₂). Celkem bylo získáno 173 selektovaných senzitivních rostlin (slibní primární kandidáti u nichž se projevila citlivost na zebularin), které byly zasety do půdy pro získání nové generace semen M₃. (obrázky Kruska, 2017, webové stránky Crop Protection a EurekAlert)

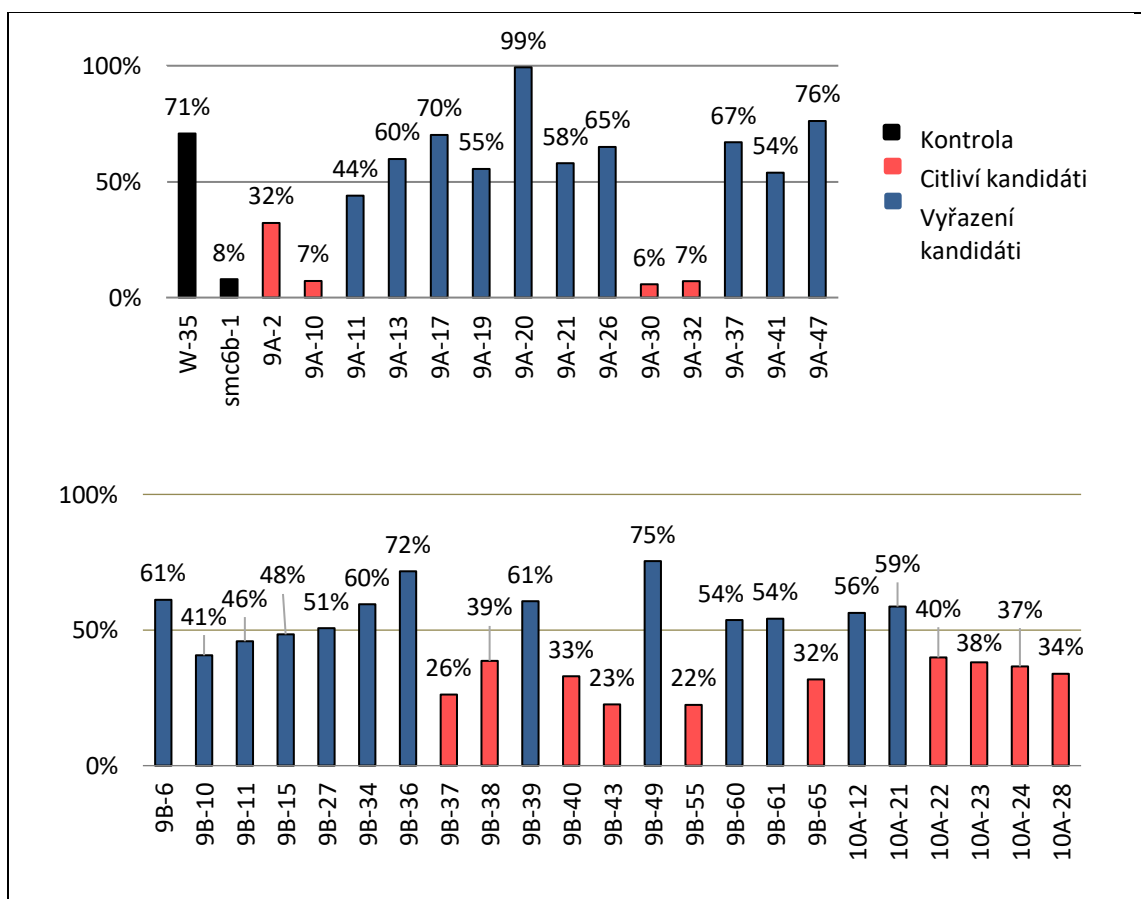
5.2 Rozlišení falešně pozitivních a pravých kandidátů

Pro rozlišení pravých citlivých kandidátů byla semena M₃ generace zaseta do 0,6% 1/2 MS média s přídatkem 20 µM zebularinu, ale také do 1/2 MS média neobsahujícího zebularin. Identifikace pravých kandidátů byla založena na porovnání délek kořínků s kontrolními rostlinami, tedy s rostlinami W-35 (Col-0), které byly vůči zebularinu rezistentní a poté se senzitivními rostlinami *smc6b-1*. Kořínky pravých senzitivních kandidátních linií dorůstaly v médiu bez zebularinu standardní délky (v porovnání s WT), avšak na médiu s přídatkem zebularinu jejich kořínky této délky nedosahovaly, byly značně kratší a u rostlin byla patrná omezenost růstu. Při tomto testu se vyčlenily linie, které byly nesenzitivní vůči zebularinu – tedy rostoucí stejně jak na médiu se zebularinem, tak na 1/2 MS médiu bez obsahu zebularinu. Dále se vyčlenili vývojoví mutanti mající malé kořínky bez závislosti na tomto inhibitoru.

Celkově se tedy od každé kandidátní linie zasadilo přibližně 30 semen na Petriho misky (vždy na jednu kontrolní a na jednu se zebularinem) a po týdenním růstu došlo k analýze velikosti kořínků vyklíčených rostlin. S vyloučenými kandidátními rostlinami se dále npracovalo, avšak na senzitivních kandidátech se tato analýza opakovala minimálně ve třech opakováních.

Všechny senzitivní rostliny byly po týdnu přeneseny na nové Petriho misky obsahující agarové médium, přičemž došlo k jejich vyrovnání a natažení kořínků. Takto srovnané rostliny byly fotografovány a pomocí programu Image J byla stanovena přesná délka jejich kořínků v mm. Průměrné délky kořínků vycházely přibližně ze 100 rostlin. Průměr kořínků se počítal pro každou linii a médium zvlášť, např. pro linii 9A-1 se měřilo přibližně 100 kořínků na médiu se zebularinem a 100 kořínků na médiu bez zebularinu. Zásadním výstupem z této analýzy byl poměr mezi průměrnou délkou kořene v médiu se zebularinem a na médiu bez zebularinu, který sloužil k porovnávání všech linií.

Tento poměr činil u kontrolní WT rostliny 71 %, což značí že průměrná rostlina W-35 měla o 29 % kratší kořen na zebularinu, než na čistém 1/2 MS médiu. Práví citliví kandidáti museli být vůči zebularinu senzitivnější, proto byl stanoven limit tohoto poměru délek na 40 %, aby došlo k jejich odlišení. Z celkových 173 slibných kandidátů se zúčastnilo několika opakování pouze 39 rostlin, avšak dané kritérium splňovalo jen 14 z nich (viz Obrázek 6 – červeně označení senzitivní kandidáti). Kandidátní linie jsou pro porování seřazeny v Tabulka 6.



Obrázek 6: Rozlišení citlivých kandidátů porovnáním poměru průměrných délek kořínků na médiu obsahující zebularin a na médiu bez zebularinu

Z průměrných délek kořínků každé analyzované rostliny (na médiu se zebularinem a na médiu bez zebularinu) byl vytvořen poměr (vyjádřen v procentech). Tento poměr sloužil k vyřazení málo citlivých rostlin na zebularin či rostlin, u kterých neměl zebularin vliv na růst kořínků. Hranice senzitivity byla stanovena na 40 %. Kandidáti, jejichž výsledný poměr délek byl >40 %, byli vyloučeni (modrá barva), naopak kandidáti s výsledným poměrem < 40% byli označeni jako citliví (praví) kandidáti (červená barva).

Tabulka 6: Porovnání kořínků testovaných rostlin na médiu bez zebularinu a se zebularinem

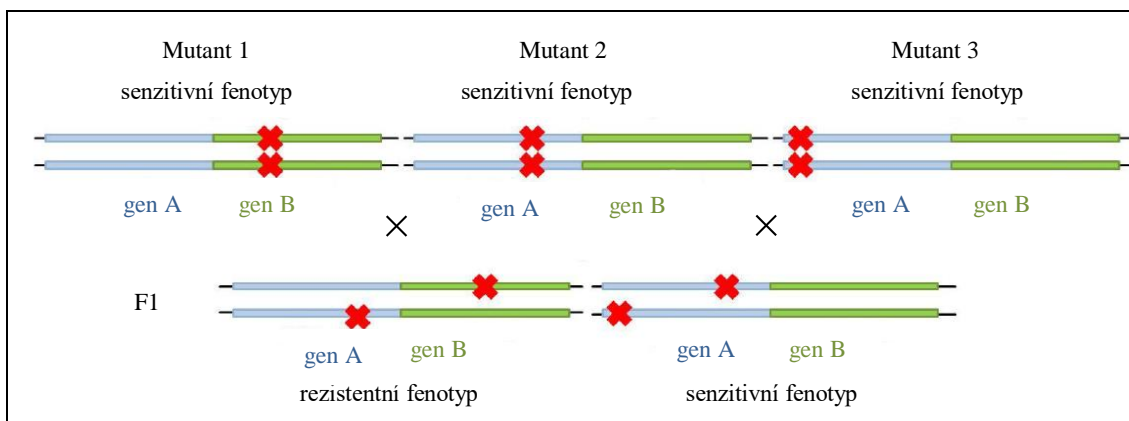
W-35		<i>smc6b-1</i>		9A-2		9A-10	
-	+	-	+	-	+	-	+
9A-30		9A-32		9B-37		9B-38	
-	+	-	+	-	+	-	+
9B-40		9B-43		9B-55		9B-65	
-	+	-	+	-	+	-	+
10A-22		10A-23		10A-24		10A-28	
-	+	-	+	-	+	-	+

V tabulce je znázorněno porovnání kořínků kontrolních rostlin (W-35 a *smc6b-1*) a vybraných kandidátů po týdenním růstu na 1/2 MS médiu bez zebularinu (-) a na 1/2 MS médiu s 20 μ M zebularinem (+)

5.3 Identifikace genů komplementací

U vybraných 14 senzitivních kandidátů došlo k fenotypovému porovnání, přičemž se hodnotila fenotypová podobnost nejen mezi těmito kandidáty, ale i podobnost s kontrolní rostlinou *smc6b-1*. Kandidát 9A-10 byl fenotypově velmi podobný právě této senzitivní kontrolní rostlině, stejně tak rostliny 9A-30 a 9A-32. Aby došlo ke zjištění, zda tyto kandidátní linie nesou mutaci ve stejném genu, bylo provedeno komplementační křížení s rostlinou *smc6b-1*.

Při této komplementaci došlo ke křížení dvou různých rostlin odrážejících stejný fenotyp. Jejich F₁ hybrid mohl mít několik výsledných fenotypových variant. Pokud by nesly křížené rostliny mutace ve stejném genu, vykazoval by jejich výsledný F₁ hybrid stejný citlivý fenotypový projev jako ony. Pokud by křížené rostliny nesly mutace v genu rozdílném, jejich hybrid by se jevil fenotypově jako WT a nesl by tuto mutaci v heterozygotním stavu, tudíž by nedošlo k manifestaci mutantního fenotypu. Na tomto principu byla postavena kontrola komplementačního testování, při níž byly kříženy vybrané rostliny s rezistentní nemutovanou rostlinou W-35. Výslední hybridi se po úspěšném křížení jeví fenotypově jako WT rostliny. Princip komplementačního křížení je znázorněn na Obrázek 7.

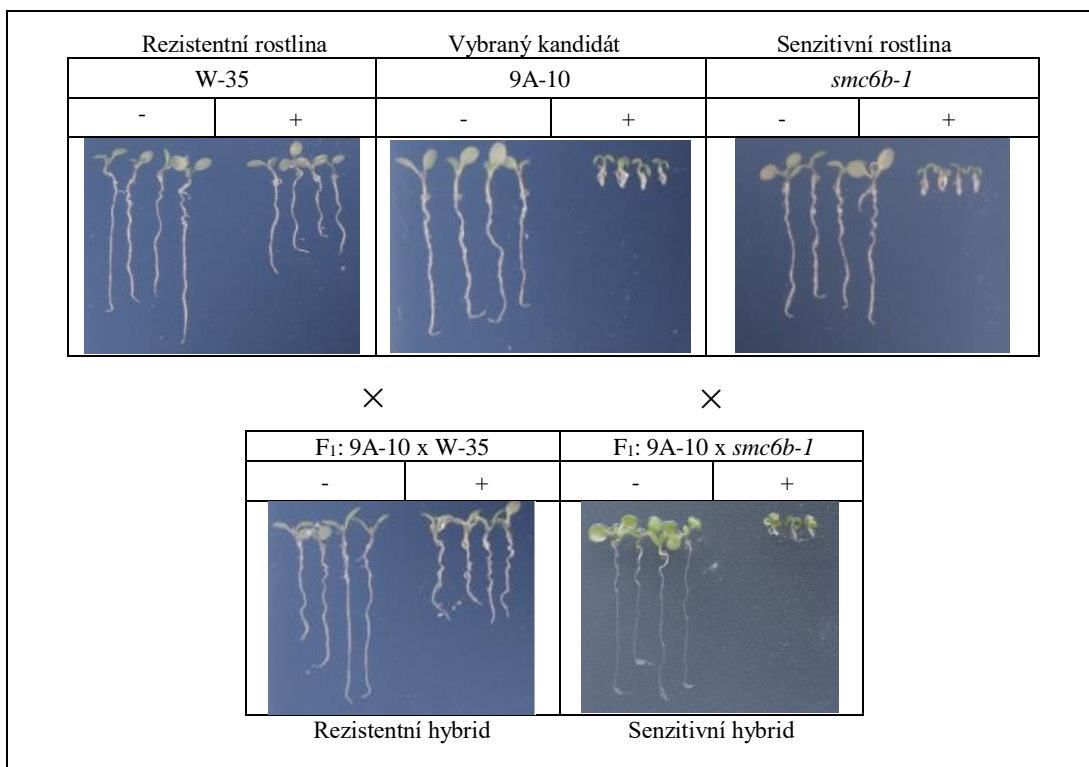


Obrázek 7: Princip komplementačního testování homozygotních mutantů

Pokud dojde ke křížení dvou mutantních rostlin nesoucí mutaci v rozdílném genu, bude mít F₁ hybrid fenotyp jako WT rostlina a bude rezistentní (mutant1 x mutant 2). Křížením dvou rostlin nesoucí mutaci ve stejném genu vznikne F₁ hybrid, jenž bude vykazovat senzitivní fenotyp (mutant 2 x mutant 3) (upraveno, Kruska, 2017)

Komplementační vyhodnocení bylo provedeno na hybridních semenech F₁ generace, jež byly opět vysety na 1/2 MS médium se zebularinem a bez zebularinu. Vyhodnocení probíhalo po sedmi dnech od vysetí semen, kdy byly znovu porovnávány průměrné délky kořínků.

První rostlinou, která se zúčastnila komplementačního křížení byla rostlina 9A-10 z toho důvodu, že se fenotypově podobala senzitivní kontrolní rostlině *smc6b-1*. Výsledky komplementačního testování jsou zobrazeny na Obrázek 8.

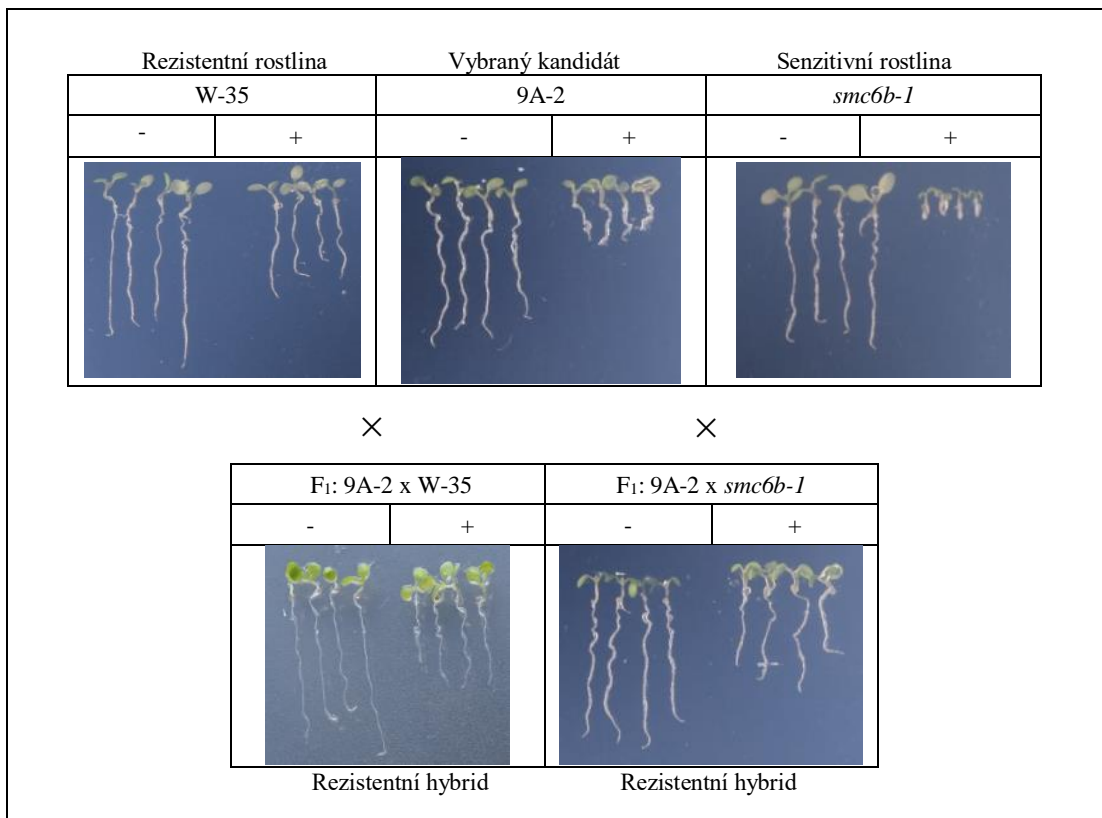


Obrázek 8: Komplementační křížení kandidátní rostliny 9A-10

Na obrázku jsou znázorněny týdenní rostliny, jež rostly na 1/2 médiu bez zebrularinu (-) a se zebrularinem (+). Křížením kandidátní rostliny 9A-10 s rezistentní rostlinou vznikl hybrid, jež byl rovněž rezistentní. Křížením 9A-10 se senzitivní rostlinou *smc6b-1* mající stejný fenotypový projev, vznikl hybrid jim podobný. Bylo zjištěno, že 9A-10 nese tedy mutaci v genu *SMC6B*.

Díky komplementačnímu testu bylo geneticky potvrzeno, že 9A-10 nese mutaci v genu *SMC6B*, jelikož u jejich společného hybrida se projeví stejné fenotypové vlastnosti jako u jeho progenitorů. Stejný postup byl proveden i u linií 9A-30 a 9A-32, u těchto kandidátů byla rovněž geneticky prokázána mutace v genu *SMC6B*.

Další komplementační test byl uskutečněn na kandidátní linii 9A-2. Ta se senzitivní kontrolní rostlině *smc6b-1* nepodobala, tudíž se předpokládalo, že nese mutaci v jiném genu. Pro ověření však byla opět křížena jak s rostlinou W-35, tak s rostlinou *smc6b-1*. Výsledky komplementačního testu jsou znázorněny na Obrázek 9.



Obrázek 9: Komplementační křížení kandidátní rostliny 9A-2

Na obrázku jsou znázorněny týdenní rostliny, jež rostly na 1/2 médiu bez zebularinu (-) a se zebularinem (+). Křížením kandidátní rostliny 9A-2 s rezistentní rostlinou vznikl hybrid, který rovněž vykazoval rezistenci. Křížením 9A-2 se senzitivní rostlinou *smc6b-1*, vznikl rezistentní hybrid. Bylo zjištěno, že 9A-2 nese mutaci v genu *SMC6B*.

Komplementační křížení rostlin 9A-2 a *smc6b-1* je typickým příkladem analýzy, při které se zjišťuje, zda kandidát nese či nese mutaci ve stejném genu. Bylo zjištěno, že kandidátní linie 9A-2 nese mutaci v genu *SMC6B*, jelikož jejich výsledný hybrid byl vůči zebularinu rezistentní.

5.4 Validace mutace v genu *SMC6B* u vybraných kandidátů

Pomocí komplementačních testů byla zjištěna pravděpodobná přítomnost mutace v genu *SMC6B* u tří linií 9A-10, 9A-30 a 9A-32. Pro potvrzení této mutace byl navržen postup využívající sekvenování genu *SMC6B* u vybraných kandidátů. Kvůli tomu, že postup nebyl zcela optimalizován a během analýzy by se mohly vyskytnout problémy, využila jsem následující princip jen na kandidátní linii 9A-10. Zbylé rostliny se měly podrobit analýze až při objasnění mutace v rostlině 9A-10.

Gen *SMC6B* má celkovou délku 7894 bp a obsahuje 28 exonů, jež jsou ohraničeny UTR (nepřekládanými) oblastmi. Struktura genu je znázorněna na Obrázku 10.



Obrázek 10: Struktura genu *SMC6B*

Struktura genu *SMC6B* (AT5G61460.1) uváděná na portálu TAIR (TAIR, 10)

V rámci této analýzy byla v programu Geneious (11.1.4.) vytvořena struktura genu *SMC6B* (viz příloha 1). Tento program umožňuje i vkládání primerů, značení daných oblastí atd. Kvůli sekvenování celého genu došlo k jeho rozdělení na dílčí oblasti, jež se nejprve amplifikovaly pomocí PCR a následně sekvenovaly. Během experimentu byl tento princip několikrát optimalizován.

Pro získání PCR produktů pro sekvenování, jsem nejprve využila stejného postupu jako Karin Kruska ve své disertační práci (2017), který obsahoval rozdělení struktury genu, jenž je dlouhý 7894 bp, na 4 oblasti označenými A–D. Získané PCR produkty se sekvenovaly ve firmě SEQme. Při hodnocení výstupů ze sekvenování bylo zjištěno, že nebyly osekvenovány překryvy a chyběly některé z kódujících oblastí, ve kterých by se mohla nacházet kauzální mutace. Ve zbylých výstupech sekvenování nebyla identifikována žádná mutace. Proto byl tento postup optimalizován a zahrnoval rozdělení genu *SMC6B* na 8 oblastí, A–H. Pro PCR amplifikaci a sekvenování bylo nutné navrhnout dodatečně primerové oligonukleotidy. Nové sekvenování tentokrát proběhlo na pracovišti ÚEB, avšak výstupní sekvence rovněž nebyly dostačující.

Nový navržený postup zahrnoval izolaci RNA a reverzní transkripci na cDNA, čímž došlo ke zmenšení celkové sekvenované oblasti na velikost 3679 bp a k urychlení analýzy. Avšak během tohoto experimentu se mi nepodařilo získat PCR produkty z cDNA, nebo jejich koncentrace byla natolik malá, že by k sekvenování nestačila.

Kompletní sekvenace genu *SMC6B* zahrnovala jeho rozdělení na 12 oblastí, A–L. Vzhledem k tomu, že tento postup vedl k získání kompletní sekvence genu *SMC6B*, bude popsán detailněji. Použité oligonukleotidy, které sloužily k získání PCR produktů A–L, jsou uvedeny v Tabulka 7. Pro PCR amplifikaci byla použita reakční směs o celkovém objemu 20 μ l (viz Tabulka 8).

Podmínky PCR amplifikace jsou uvedeny v Tabulka 9, pro jednotlivé produkty se amplifikace liší pouze v teplotě nasedání primerových oligonukleotidů, zbylé podmínky zůstaly neměnné.

Tabulka 7: Oligonukleotidy použité při amplifikaci daných oblastí genu *SMC6B*

Produkt	Velikost produktu [bp]	Primer forward	Primer reverse
A	887	smc6b_PCR_1fw	smc6b_PCR_A1rs
B	1249	smc6b_PCR_seq2fw	smc6b_PCR_1rs
C	758	smc6b_PCR_seq2fw	smc6b_PCR_seq2rs
D	2320	smc6b_PCR_2fw	smc6b_PCR_2rs
E	1389	smc6b_PCR_seq4fw	smc6b_PCR_2rs
F	1446	smc6b_PCR_B3fw	smc6b_PCR_C1rs
G	1731	smc6b_PCR_3fw	smc6b_PCR_exon17rs
H	1394	smc6b_PCR_seq7fw	smc6b_PCR_3rs
I	1191	smc6b_PCR_exon16fw	smc6b_PCR_3rs
J	1580	smc6b_PCR_4fw	smc6b_PCR_4rs
K	936	smc6b_PCR_seq10fw	smc6b_PCR_4rs
L	662	smc6b_seq11fw	smc6b_seq11rs

Tabulka 8: Složení PCR reakční směsi pro amplifikaci genu *SMC6B*

Látka	Objem 20 μ l
5x PCR pufr	4 μ l
DNA, cDNA	1 μ l
Primer forward	2 μ l
Primer reverse	2 μ l
Polymeráza Phusion	0,75 μ l
2 mM dNTPS	2 μ l
H ₂ O	8,45 μ l

Tabulka 9: Podmínky PCR amplifikace pro získání produktů A–L genu *SMC6B*

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98	4 min	1
PCR amplifikace	98	30 s	37
	Produkty A, B, C, K, H 61 °C		
	Produkty E, F, G 55 °C		
	Produkty D I, J, I, L 57 °C		
	72	2 min	
Závěrečná elongace	72	3 min	1

Amplifikované PCR produkty byly separovány pomocí horizontální elektroforézy v gelu skládajícího se z 1% agarózy, 1x TAE pufru a z přísady 0,5 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ ethidium bromidu (EtBr). Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě pod napětím 90 V. Pro orientační stanovení velikosti fragmentů DNA byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Vizualizace produktů byla zprostředkována pomocí UV transiluminátoru.

Získané PCR produkty byly následně purifikovány s využitím souprav QIAprep Spin Miniprep Kit nebo QIAquick Gel Extraction Kit, obě soupravy pocházely z firmy Qiagen. Gel Extraction Kit byl využit u vzorků, které obsahovaly kromě vyžadujícího amplifikovaného PCR produktu i jiné nespecifické produkty. Před samotnou purifikací musel být vyžadovaný PCR produkt vyříznut z gelu, zvážen a rozpuštěn s příslušným množstvím pufru dodávaným od výrobce, jenž je součástí soupravy. U vzorků bez nespecifických produktů byl využit pro purifikaci Spin Miniprep Kit. Postupovalo se vždy dle instrukcí výrobce.

Purifikované PCR produkty se sekvenovaly ve firmě Macrogen a SEQme, avšak před odesláním vzorků bylo nutné PCR produkty zakoncentrovat. Jedna sekvenační reakce vyžadovala smíchání 5 μl zakoncentrované PCR s 5 μl určitého primeru o koncentraci 10 pmol/ μl .

Sekvenováním byla získána kompletní sekvence genu *SMC6B*, ačkoliv mezi 17. a 20. exonem nedosahoval tento výstup vysoké kvality a ve „trace file“ chromatogramu ze sekvenování byla detekována větší míra signálu pozadí, který v určitých místech převyšoval signál hlavní a vyvozoval falešné výsledky. Po důkladné analýze všech výstupů však nebyla objevena žádná mutace, která by se nacházela v kódujících oblastech genu *SMC6B*. Příčiny a důvody týkající se tohoto výsledku jsou zahrnuty v diskusi.

Kvůli časové náročnosti práce a komplikacím v rámci experimentu jsem se k identifikaci mutací u dalších dvou kandidátních linií (9A-30 a 9A-32) nedopracovala, avšak ráda bych se této analýze věnovala v rámci diplomové práce.

5.5 Vytvoření hybridní F₂ generace kandidátů nesoucí neznámé mutace

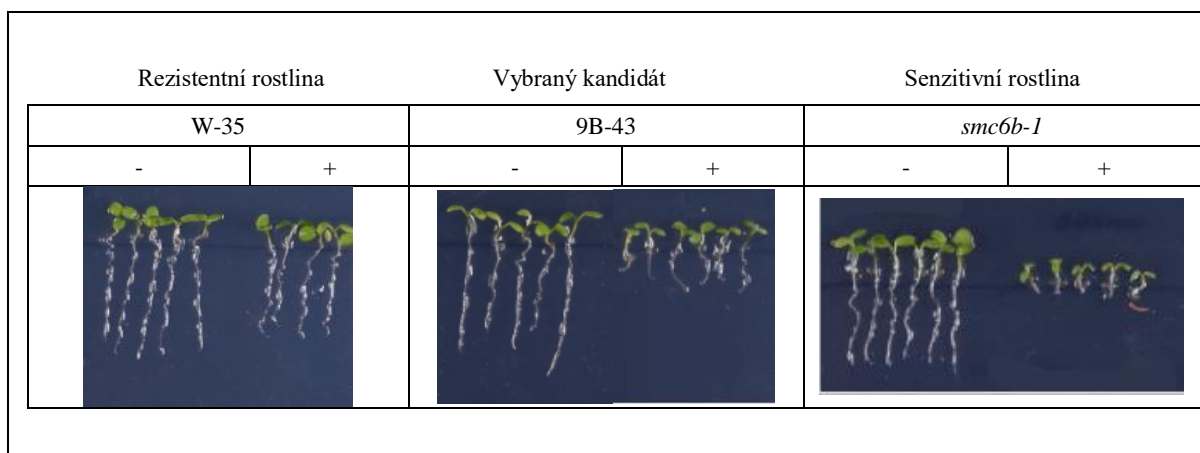
Již v kapitole 5.3 byla popsána identifikace mutací na základě komplementačního křížení. Na příkladu křížení linií 9A-2 a *smc6b-1* bylo poukázáno na to, jak lze odlišit neznámé mutace. Díky komplementačnímu testu bylo zjištěno, že rostlina 9A-2, která se již od pohledu fenotypově lišila od senzitivní rostliny *smc6-1b*, nese mutaci v genu *SMC6B*, jelikož jejich výsledný hybrid byl vůči zebularinu rezistentní. Výsledek tohoto komplementačního testu je zobrazen na Obrázek 9.

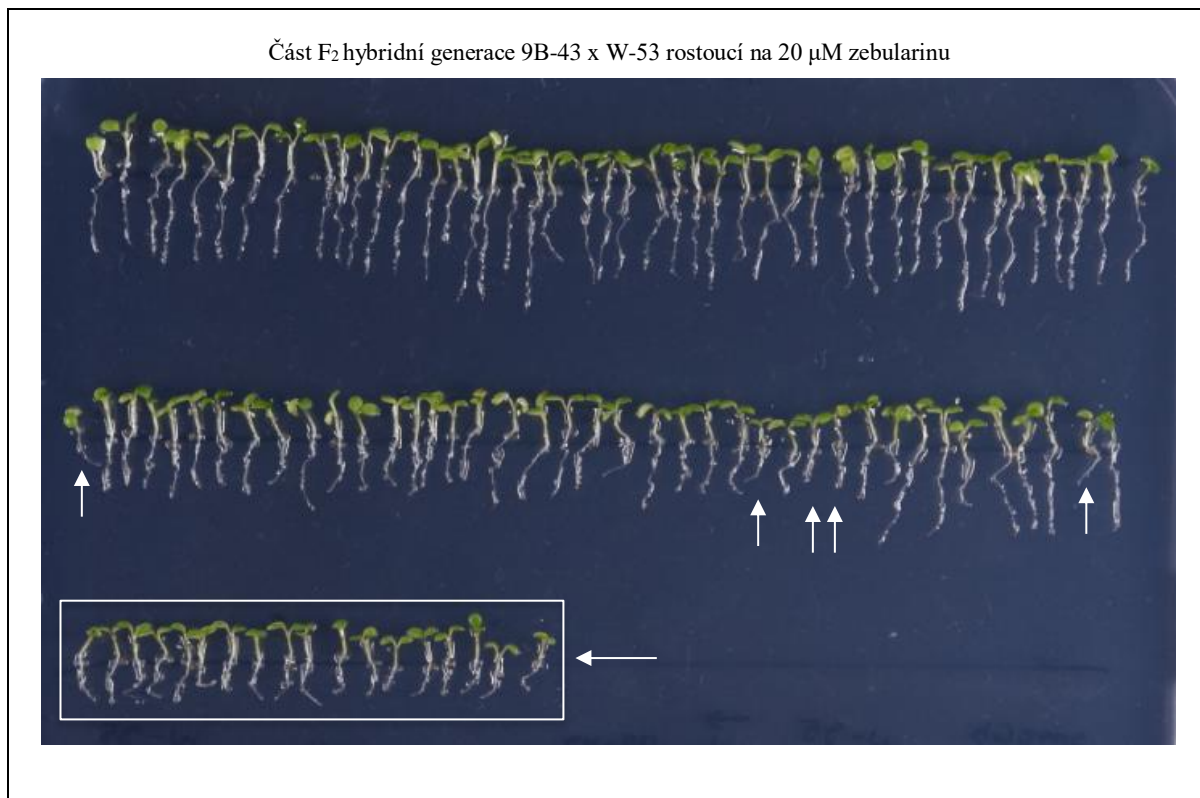
Díky této analýze bylo možné uvažovat, že i zbylí, fenotypově odlišní kandidáti nenesou mutaci v genu *SMC6B*, tudíž další komplementační testy s touto senzitivní rostlinou se již neprováděly. Výsledek testu by byl totiž vždy stejný a hybridní rostliny by vykazovaly rezistenci. Tito kandidáti byli kříženi pouze s rostlinou W-35 pro získání mapovací populace, která dále slouží k identifikaci mutací v neznámém genu.

Vybraní kandidáti byli kříženi s WT linií – W35, která je vůči zebularinu rezistentní, což vedlo k získání hybridních semen F₁ generace. Tato hybridní semena byla zasazena do média bez zebularinu a po 1-2 týdnech růstu byly vyklíčené rostliny přeneseny do zeminy. Hybridní F₁ rostliny se samosprášily, čímž došlo k získání semen F₂ generace, která se po sesbírání vysušila a uskladnila pro další analýzu.

Mapovací populaci F₂ jsem vytvořila pouze pro dvě linie 9B-38 a 9B-43. Semena F₂ generace jsem podrobila analýze na 1/2 MS médiu s 20 µM zebularinem. Přibližně ze 400 vyklíčených rostlin byly vybrány jen ty, které vykazovaly citlivost vůči zebularinu. Segregace pro recesivní fenotyp by měla vycházet dle mendelovských zákonitostí v poměru 1:3, avšak v mém experimentu činila tato segregace 18 % u obou linií.

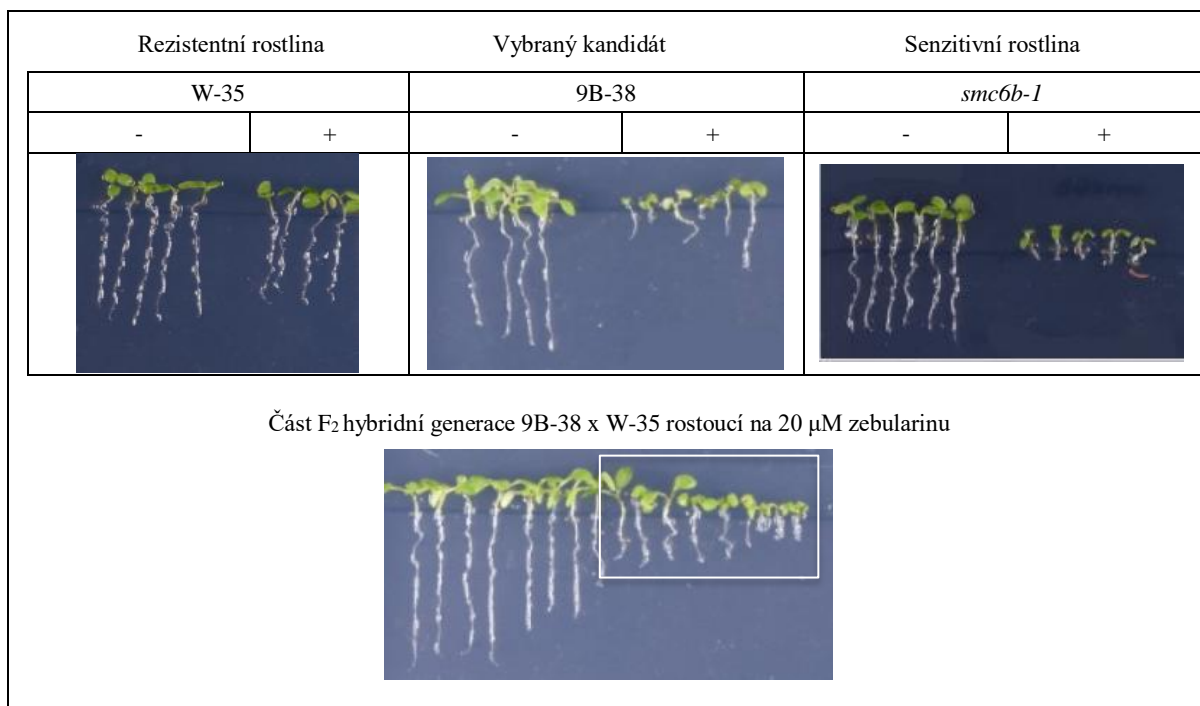
Hybridní F₂ generace 9B-43 x W-35 ze které byly vybírány rostliny tvořící mapovací populaci je zobrazena na Obrázek 11. Hybridní F₂ generace 9B-38 x W35 je zobrazena na obrázku 12.





Obrázek 11: F₂ hybridní rostliny 9B-43 x W-35

Na obrázku jsou znázorněny týdenní rostliny, jež rostly na 1/2 médiu bez zebularinu (-) a s 20 μM zebularinem. Uvedeny jsou kontrolní nehybridizované rostliny – rezistentní kontrola W-35, kandidát 9B-43 a senzitivní kontrola *smc6b-1*; hybridizované rostliny F₂ generace W-35 x 9B-43 rostoucí na 20 μM zebularinu. Bílé šipky značí část rostlin, které byly selektovány a sloužily k vytvoření mapovací populace.



Obrázek 12: F₂ hybridní rostliny 9B-38 x W-35

Na obrázku jsou znázorněny týdenní rostliny, jež rostly na 1/2 médiu bez zebularinu (-) a s 20 μM zebularinem. Uvedeny jsou kontrolní nehybridizované rostliny – rezistentní kontrola W-35, kandidát 9B-38 a senzitivní kontrola *smc6b-1*; hybridizované rostliny F₂ generace W-35 x 9B-38 rostoucí na 20 μM zebularinu. V bílém rámečku je zaznačena část rostlin, které byly selektovány a sloužily k vytvoření mapovací populace.

Selektované senzitivní F_2 rostliny byly očistěny od média a semenného obalu, následně byly přeneseny do 2 ml zkumavek a sloužily k izolaci gDNA. Získané gDNA budou použity pro další výzkum v navazující diplomové práci, stejně jako získaná hybridní F_2 semena kandidátních liniích, která jsou potřebná k vytvoření mapovací populace.

6 DISKUSE

Výzkum zaměřující se na analýzu genů podílejících se na opravách DNA-proteinových crosslinků na Ústavu experimentální botaniky AV ČR pod vedením Mgr. habil. Aleše Pečinky, Ph.D. využívá principu SHORE mapování fenotypových mutantů. Tento výzkum je jedinečný tím, že od samého začátku experimentu není znám zájmový gen a nestudují se jeho dopady změn, jako je tomu v reverzní genetice. Naopak využívá EMS mutagenizovanou populaci huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a identifikuje zasažené geny selektivně díky senzitivitě na methyltransferázový inhibitor zebularin.

Podobná metoda mapování genů byla uplatněna i v jiných výzkumných týmech. Britt a kolektiv (1993) se zaměřili na identifikaci genů v EMS mutagenizované populaci huseníčku rolního, přičemž mutagenizovaná semena byla po vysetí vystavena UV-B záření (290–320 nm) a sledovala se jejich senzitivita projevující se malým růstem kořínků. Vlivem mutagenese EMS došlo k poškození různých genů, přičemž byly selektovány pouze rostliny, jejichž genové mutace způsobily citlivost vůči UV-B záření. Mezi takto poškozené geny patřily např. geny podílející se na opravách pyrimidinových dimerů.

Experimentální část mé bakalářské práce navazovala na výzkum Karin Krusky, která tento výzkum vykonávala v rámci své disertační práce (2017) v Max Planck Institute for Plant Breeding Research v Kolíně nad Rýnem a obhájila na Ruhr University Bochum. Pro svůj výzkum využila EMS mutagenizovaná semena skupin označených čísly 1–8 z M_2 generace. U vybraných mutantních kandidátů identifikovala známé mutace v genech *SMC6B* a *KU70* jež mají typický fenotypový projev. Charakterizovala jejich příčinu, přičemž využívala komplementační křížení a sekvenování. K identifikaci mutací v neznámých genech využila mapovací populace a bioinformatickou analýzu. Mezi takto identifikované mutované geny patřil například gen regulátoru telomerové elongace helikáza 1 (RTEL1), o které je známo, že hraje ústřední roli při zachování stability genomu.

Pro můj výzkum byly využity tři skupiny mutagenizovaných semen M_2 generace – 9A, 9B a 10A. Tato semena byla vystavena účinkům 7,5 μM zebularinu, který byl přidán do růstového média 1/2 MS. Po týdenním růstu se selektovala semena, jež vykazovala senzitivitu a sloužila pro získání semen M_3 generace na nichž probíhala další analýza hledající kandidáty nesoucí recesivní mutaci. U tří rostlin pocházející ze skupiny 9A byla zjištěna známá mutace nacházející se v genu *SMC6B*, která se u mutantních rostlin po vystavení činidlu zebularinu projevuje typickým fenotypem – extrémně krátkou délkou kořínku. Jednalo se o kandidátní linie 9A-10, 9A-30 a 9A-32.

Všeobecně strukturní stabilizující či udržovací komplexy chromozomů (Structural maintenance of chromosomes, SMC), jak je již patrné z jejich názvu, jsou nezbytné pro organizaci, dynamiku a stabilitu genomu. Komplex kohesinu (SMC1 a SMC3) zajišťuje soudržnost sesterských

chromatid. Komplex kondenzinu (SMC2 a SMC4) kondenzaci chromozomů a SMC5/6 komplex se zaměřuje na udržení stability genomu (Cobbe *et* Heck, 2004). Komplex SMC5/6 byl identifikován na základě citlivosti mutantů na genotoxický stres. Z dalších výzkumů zabývajících se tímto komplexem vyplývá, že má v buňkách mnoho úloh. V rané fázi komplex udržuje pozastavené replikační vidličky (RF) v konformaci, která umožňuje znovu jejich obnovení (Irmisch *et al.*, 2009). Další funkce ovlivňuje pozdní fázi rekombinace a může rozvolňovat toxické DNA struktury. Tato funkce vysvětluje vady v opravě DNA, jako jsou chybná segregace chromozomů a nestabilita rDNA (Ampatzidou *et al.*, 2006; Irmisch *et al.*, 2009).

Komplex SMC5/6 se skládá ze dvou hlavních složek SMC5, SMC6, která je u huseníčku zastoupena dvěma geny *SMC6BA* či *SMC6B*. Kromě těchto podjednotek se uvnitř komplexu nachází dalších 6 „NON SMC“ podjednotek uváděné jako NSE. Komplex SMC5/6 je rozdělen do tří subkomplexů: NSE2-SMC5-SMC6, NSE1-NSE3-NSE4 a NSE5-NSE6 (Palecek *et al.*, 2006). V modelu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* byly objasněny funkce komponent a faktorů, avšak u rostlin jsou tyto podjednotky stále cílem výzkumů zabývajících se přesnější funkcí a interakcí (Watanabe *et al.*, 2009).

Dimer SMC5-SMC6 má funkci jako centrální kostra celého komplexu SMC5/6. Podjednotka NSE2 se kovalentně váže na SMC5 podjednotku a je spojována s aktivitou SUMO ligázy, která usnadňuje přidání malého modifikátorového proteinu ke specifickým cílovým proteinům. SUMO modifikace se podílí na různých buněčných procesech, jako je regulace transkripce, apoptóza či stabilita proteinu. Avšak zda lze všechny tyto procesy přiřadit právě k NSE2, je stále předmětem spekulací (Andrews *et al.*, 2005). Ačkoliv je NSE2 podjednotka důležitá, nemá její mutace na huseníček zhoubné účinky. Mutanti jsou životaschopní, avšak mají výrazný fenotyp projevující se snížením růstu, deformovanými listy, rostliny jsou sterilní nebo produkují jen malé množství semen.

Během mé analýzy genu *SMC6B* u kandidátní linie 9A-10 jsem nejprve provedla komplementační křížení s rostlinou *smc6b-1*, díky čemuž se potvrdilo, že senzitivní linie 9A-10 nese mutaci v genu *SMC6B*.

Postup zaměřující se na sekvenaci genu *SMC6B* byl několikrát během výzkumu optimalizován. Efektivní postup zahrnoval rozdělení genu na oblasti A–L (viz kapitola 5.4 či příloha 2). Sekvenování proběhlo ve firmě Macrogen a ve firmě SEQme. Během tohoto sekvenování již byla získána celá sekvence genu, ačkoliv mezi 17. a 20. exonem nedosahoval tento výstup vysoké kvality a ve „trace file“ chromatogramu ze sekvenování byla detekována větší míra signálu pozadí. Tento signál pozadí v určitých místech mírně převyšoval signál hlavní a vyvozoval falešné výsledky. Po důkladné analýze všech výstupů však nebyla objevena žádná kauzální mutace, která by se nacházela v kódujících oblastech genu. Pro ověření tohoto tvrzení však bude

ještě nutné znovu osekvenovat oblast mezi 17. a 20. exonem a zamezit signálům pozadí jinou volbou purifikace.

Pokud by získané výsledky ze sekvenování potvrdily nepřítomnost mutace mezi těmito exony, je možné uvažovat nad tím, že hledaná mutace se může nacházet v promotorové oblasti genu, což je regulační oblast, na kterou nasedá RNA polymeráza a další proteiny, které podmiňují rozvolnění dvoušroubovice DNA a počátek transkripce. Pokud by rostliny nesly mutaci v promotoru, měly by sníženou či zcela zastavenou transkripci. Pro analýzu této mutace by se využila reverzní transkripce a kvantitativní PCR. Následně by byla sekvence promotoru osekvenována a z výstupů sekvenování by se v této oblasti hledala mutace.

Další variantou je, že komplementační křížení kandidátní linie 9A-10 a *smc6b-1* nebylo provedeno správně a mohlo dojít u rostliny 9A-10 ke samosprášení, což by indukovalo „falešně pozitivní“ výsledek. Tato možnost je méně pravděpodobná, jelikož proces komplementačního křížení probíhá pod lupou, přičemž jsou květy s pestíky kontrolovány jak v den emastikulace, tak i v den, kdy dochází ke sprášení s odlišnou rostlinou.

Ačkoliv se mi nepodařilo přesně určit příčinu mutace u linie 9A-10, navržený optimalizovaný postup sekvenování genu *SMC6B* může posloužit pro zjištění mutace v kandidátních liniích 9A-30 a 9A-32, které dle komplementačních testů rovněž nesou mutaci v genu *SMC6B*. Jejich analýzou bych se chtěla zabývat v rámci navazující diplomové práce.

Pro identifikaci mutací v neznámém genu bylo nutné kandidáty podrobit komplementačnímu křížení s WT rostlinou W-35. Hybridní F₁ generace se nechala samosprášit a vedla k získání semen F₂ generace. Tato semena byla vysušena a uskladněna pro další analýzu. U dvou rostlin 9B-38 a 9B-43 jsem z hybridních semen F₂ pomocí selekce získala gDNA pro mapovací populaci. Získaný materiál bude rovněž sloužit k dalšímu výzkumu v navazující diplomové práci.

7 ZÁVĚR

V rámci výzkumu pod vedením Mgr. habil. Aleše Pečinky, Ph.D. na Ústavu experimentální botaniky AV ČR, jsem si osvojila metody a principy, které se využívají pro mapování genů. Kromě prohloubení znalostí týkajících se této problematiky, jsem byla schopná ze získaných poznatků navrhnout a optimalizovat postup vlastní experimentální analýzy a rovněž jej aplikovat v praxi. Díky tomu, jsem se naučila samostatně pracovat v laboratoři. Ve výzkumu jsem využila nejen biologické a genetické metody, jako je komplementační křížení, ale také molekulární – izolace DNA, izolace RNA, PCR amplifikace a purifikace produktů, či reverzní transkripce atd., nebo také metody bioinformatické – navržení struktury genů, primerových oligonukleotidů a analýza výstupních sekvencí ze sekvenování.

Cílem mé práce bylo přispět k identifikaci genů, které se podílejí na opravách DNA-proteinových komplexů u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Pro tuto analýzu jsem využila EMS mutagenizované rostliny, jež byly selektovány na médiu s přidavkem metyltransferázového inhibitoru zebularinu, který se kovalentně váže na DNA-methyltransferázy a tvoří DNA-proteinové crosslinky, které zabraňují správné expresi genů a opravě DNA.

V rámci výzkumu jsem objevila tři nové alely nesoucí mutaci v genu *SMC6B* (u linií 9A-10, 9A-32 a 9A-30). Pro jejich identifikaci jsem využila komplementační křížení se senzitivní kontrolní rostlinou *smc6b-1*. Dále jsem se snažila objasnit příčinu mutace v kandidátní linii 9A-10, avšak z výsledků sekvenování se mi kauzální mutaci v kódujících oblastech genu *SMC6B* nepodařilo nalézt. Je zde možnost, že hledaná mutace se může nacházet v oblasti promotoru. Pro toto tvrzení však bude nutné provést další experimenty.

U rostlin nesoucích mutace způsobující citlivost k DNA-proteinovým crosslinkům v neznámých genech vedl výzkum k získání F2 hybridních semen pro mapovací populaci pomocí komplementačního křížení s nemutagenizovanou rostlinou W-35 (Col-0). Získaný materiál bude sloužit k dalším výzkumům.

8 LITERATURA

- Alonso, J.M., Ecker, J.R. (2006). Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in Arabidopsis. *Nature Reviews Genetics* 7, 524–536.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N. (2003). T-DNA mutagenesis in Arabidopsis. in plant functional genomics, New Jersey: Humana Press, 177–188.
- 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.
- Bakkenist, C.J., Kastan, M.B. (2004). Initiating cellular stress responses. *Cell* 118, 9–17.
- Barker, S., Weinfeld, M., Murray, D. (2005). DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutation Research*. 589, 111–135.
- Barzilai, A., Yamamoto, K.-I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 3, 1109–1115.
- 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.
- Bayou, K. (2017). Current techniques and applications of reverse genetics: An Overview. *International Journal of Genetics* 7, 31–37.
- Bird, A. (1999). DNA methylation de novo. *Science* 286, 2287–2288.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Development*. 16, 6–21.
- Britt, A.B. (1996). DNA damage and repair in plants. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 75–100.
- 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.
- Cheng, C.-Y., Krishnakumar, V., Chan, A.P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., Town, C.D. (2017). Araport11: A complete reannotation of the Arabidopsis thaliana reference genome. *The Plant Journal* 89, 789–804.

- Cimprich, K.A., Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature reviews Molecular Cell Biology* 9, 616–627.
- Cobbe, N., Heck, M.M.S. (2004). The evolution of SMC proteins: Phylogenetic analysis and structural implications. *Molecular Biology and Evolution* 21, 332–347.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.
- Davis, B.J., Havener, J.M., Ramsden, D.A. (2008). End-bridging is required for pol μ to efficiently promote repair of noncomplementary ends by nonhomologous end joining. *Nucleic Acids Research* 36, 3085–3094.
- Doitsidou, M., Jarriault, S., Poole, R.J. (2016). Next-generation sequencing-based approaches for mutation mapping and identification in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 204, 451–474.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457–463.
- Fortini, P. (2003). The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie* 85, 1053–1071.
- 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.
- Gibson, E.G., Dewese, Joseph.E. (January). Covalent poisons of topoisomerase II. *Current Topics in Pharmacology* 2013, 1–12.
- Grossman, L., Caron, P.R., Mazur, S.J., Oh, E.Y. (1988). Repair of DNA-containing pyrimidine dimers. *The FASEB Journal* 2, 2696–2701.
- Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R., Zamir, A. (1965). Structure of a ribonucleic acid. *Science* 147, 1462–1465.
- Hsu, P.D., Lander, E.S., Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262–1278.
- 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. *Translational Cancer Research* 2, 144.

- Ide, H., Shoukamy, M.I., Nakano, T., Miyamoto-Matsubara, M., Salem, A.M.H. (2011). Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks. *Mutat. Res.* 711, 113–122.
- Ide, H., Nakano, T., Shoukamy, M.I., Salem, A.M.H. (2015). Formation, repair, and biological effects of DNA–protein crosslink damage. *Advances in DNA Repair*.
- 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.
- Jeandroz, S., Lamotte, O. (2017). Plant responses to biotic and abiotic stresses: Lessons from Cell Signaling. *Frontiers in Plant Science* 8, 1772
- Jiang, F., Doudna, J.A. (2017). CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annual Review of Biophysics* 46, 505–529.
- Khanna, K.K., Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 27, 247–254.
- Kim, Y.S. (2006). Analysis of gene expression upon DNA damage in *Arabidopsis*. *Plant Biology* 49, 298–302.
- Kim, Y., Schumaker, K.S., Zhu, J.K. (2006) EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology*, 323, 101-103.
- Klages-Mundt, N.L., Li, L. (2017). Formation and repair of DNA-protein crosslink damage. *Sci China Life Sci* 60, 1065–1076.
- Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K., Ohnishi, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of Nucleic Acids* 2010.
- Krokan, H.E., and Bjørås, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 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., Uanschou, C., Chen, D., Schlogelhofer, P. (2012). The recombinases DMC1 and RAD51 are functionally and spatially separated during meiosis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24, 2058–2070.
- Kuykendall, J.R., Bogdanffy, M.S. (1994). Formation and stability of acetaldehyde-induced crosslinks between poly-lysine and poly-deoxyguanosine. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 311, 49–56.

- Larsen, A.K., Skladanowski, A., Bojanowski, K. (1996). The roles of DNA topoisomerase II during the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 2, 229–239.
- 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.
- 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.
- Lodish, H., Kaiser, C.A., Bretscher, A., Amon, A., Berk, A., Krieger, M., Ploegh, H., Scott, M.P. (2013). Molecular genetic techniques. In *Molecular Cell Biology*, pp. 212
- Meinke, D.W. (1998). Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis. *Science* 282, 662–682.
- Mladenov, E., Iliakis, G. (2011). The pathways of double-strand break repair. In *DNA Repair - On the pathways to fixing DNA damage and errors*, pp. 143-168
- Moresco, E.M.Y., Li, X., Beutler, B. (2013). Going forward with genetics: recent technological advances and forward genetics in mice. *The American Journal of Pathology* 182, 1462.
- Naegeli, H. (1997). DNA structure: Inherent instability and genotoxic reactions. In *Mechanisms of DNA Damage Recognition in Mammalian Cells*, pp, 47–70.
- Orta, M.L., Pastor, N., Burgos-Morón, E., Domínguez, I., Calderón-Montaño, J.M., Huertas Castaño, C., López-Lázaro, M., Helleday, T., Mateos, S. (2017). Zebularine induces replication-dependent double-strand breaks which are preferentially repaired by homologous recombination. *DNA Repair, Amsterdam* 57, 116–124.
- Page, D.R., Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: Arabidopsis thaliana. *Nature Reviews Genetics* 3, 124–136.
- 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.
- Pecinka, A., Liu, C.-H. (2014). Drugs for plant chromosome and chromatin research. *Cytogenetic and Genome Research* 143, 51–59.
- Peters, J.L., Cnudde, F., Gerats, T. (2003). Forward genetics and map-based cloning approaches. *Trends in Plant Science* 8, 484–491.
- Petruseva, I.O., Evdokimov, A.N., Lavrik, O.I. (2014). Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair. *Acta Naturae* 6, 23–34.

- Pikaard, C.S., Mittelsten Scheid, O. (2014). Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, a019315
- 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.
- Reisz, J.A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W., Furdui, C.M. (2014). Effects of ionizing radiation on biological molecules—Mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidand and Redox Signaling* 21, 260–292.
- Rich, T., Allen, R.L., Wyllie, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777–783.
- Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H.K., Hohn, B. (2000). Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* 406, 98–101.
- Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T., Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 981–993.
- San Filippo, J., Sung, P., Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annual review of Biochemistry* 77, 229–257.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of Biochemistry* 73, 39–85.
- Sander, J.D., Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas9 and targeted genome editing: A new era in Molecular Biology. *Nature Biotechnology* 32, 347–355.
- Schneeberger, K., 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.
- Sehorn, M.G., Sigurdsson, S., Bussen, W., Unger, V.M., Sung, P. (2004). Human meiotic recombinase Dmcl promotes ATP-dependent homologous DNA strand exchange. *Nature* 429, 433–437.
- Setlow, R.B., Swenson, P.A., Carrier, W.L. (1963). Thymine dimers and inhibition of DNA synthesis by ultraviolet irradiation of cells. *Science* 142, 1464–1466.

- Stingele, J., Jentsch, S. (2015). DNA-protein crosslink repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *16*, 455–460.
- Sun, H., Schneeberger, K. (2015). SHOREmap v3.0: Fast and accurate identification of causal mutations from forward genetic screens. In *Plant Functional Genomics*, 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. *Toxicological Sciences* *120*, 130–145.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* *408*, 796–815.
- IARC (1992). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Solar and ultraviolet radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, *55*, 1–316.
- 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.
- Tripathy, B.C., Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior* *7*, 1621–1633.
- Vanyushin, B.F. (2006). DNA methylation in plants. In *DNA Methylation: Basic Mechanisms*, Berlin, pp. 67–122.
- Walport, L.J., Hopkinson, R.J., Schofield, C.J. (2012). Mechanisms of human histone and nucleic acid demethylases. *Current Opinion in Chemical Biology* *16*, 525–534.
- Watanabe, K., Pacher, M., Dukowic, S., Schubert, V., Puchta, H., Schubert, I. (2009). The structural mainstay of chromosomes $\check{R}/6$ complex promotes sister chromatid alignment and homologous recombination after DNA damage in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* *21*, 2688–2699.
- Zhai, Z., Sooksa-nguan, T., Vatamaniuk, O.K. (2009). Establishing RNA interference as a reverse-genetic approach for gene functional analysis in protoplasts. *Plant Physiology* *149*, 642.
- Zhang, C., Quan, R., Wang, J. (2018). Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing. *Human Molecular Genetics* *27*, 79–88.
- Zhou, B.-B.S., Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* *408*, 433–439.

Internetové zdroje

Arabidopsis thaliana.: Crop Protection [online]. [navštíveno 24. 4. 2019]. Dostupné z:

<https://plantevaernonline.dlbr.dk/cp/graphics/Name.asp?Language=en-la&TaskID=1&NameID=10>

Belfield, Eric. Arabidopsis thaliana. In: Eurekaalert [online]. University of Oxford

[navštíveno 24. 4. 2019]. Dostupné z:

<https://www.eurekaalert.org/multimedia/pub/159783.php>

DNA repair: Natural protective mechanism against cancer [online]. [navštíveno 24. 4. 2019].

Dostupné z: <https://sites.google.com/site/bi6101dnarepair/damage-detection-response/types-of-dna-damage>

SMC6B: AT5G61460. The Arabidopsis Information Resource: TAIR, 2003 [online].

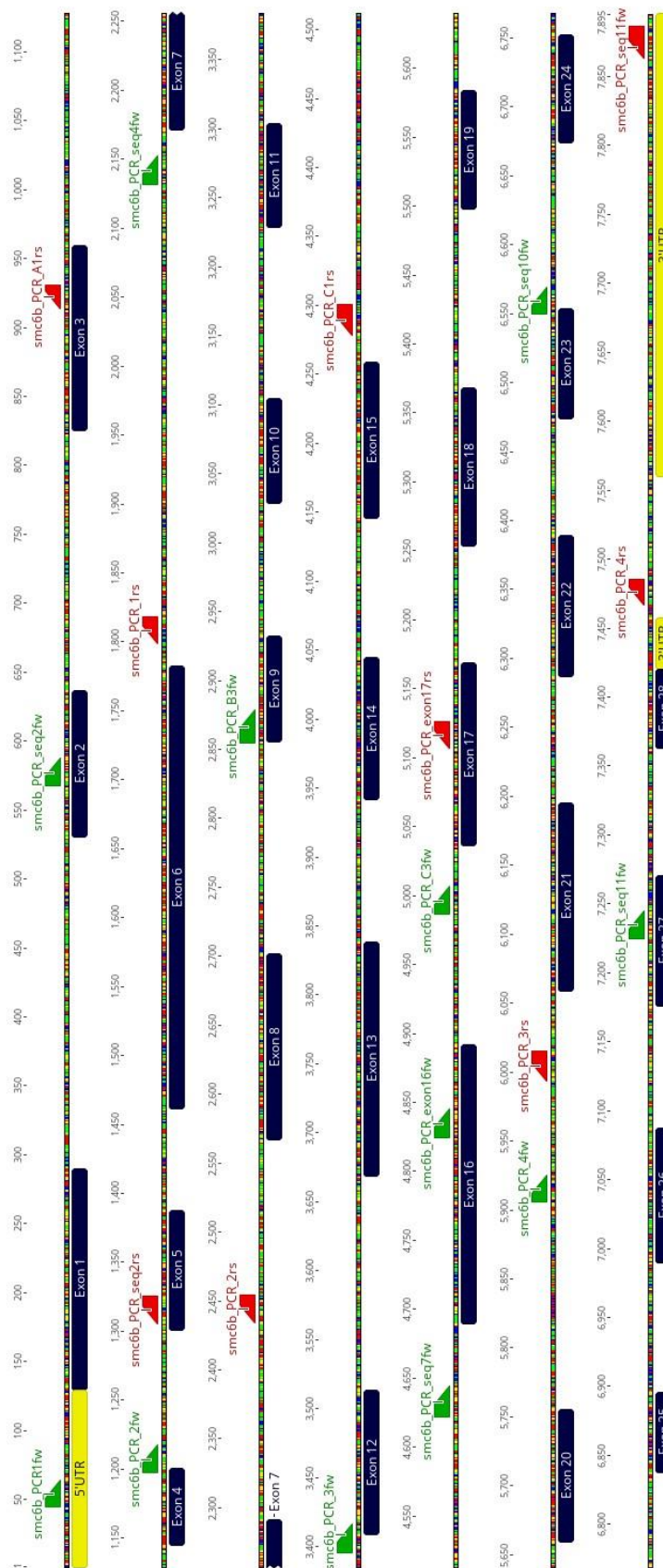
[navštíveno 24. 4. 2019]. Dostupné z:

<https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=AT5G61460>

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Struktura genu *SMC6B* vytvořena v programu Geneious 11.1.4.

Znázorněny jsou kódující sekvence (exony), forward a reverse oligonukleotidy použité pro PCR amplifikaci.



Příloha 2: Rozdělení genu *SMC6B* na menší sekvence A-L

Rozdělení bylo nutné kvůli PCR amplifikaci a následné sekvenaci. Vytvořeno v programu Geneious 11.1.4.

