

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2023**

**Kateřina Šléglová**

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



**Příprava plasmidových konstruktů WSS1A a STUbL2  
pro studium interaktorů u *Arabidopsis thaliana***

**Bakalářská práce**

**Kateřina Šléglová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2023**

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

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina ŠLÉGLOVÁ**  
Osobní číslo: **R20728**  
Studijní program: **B1501 Biologie**  
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Příprava plasmidových konstruktů STUbl2 a WSS1A pro studium interaktorů u *Arabidopsis thaliana***  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

1. PCR amplifikace, gelová elektroforéza a purifikace PCR produktů
2. Klonování pomocí Gateway strategie, transformace *E. coli*, colony PCR
3. Extrakce plasmidů, jejich ověření Sangerovým sekvenováním
4. Transformace binárních plasmidů do *A. tumefaciens*
5. Transformace rostlin *A. thaliana* metodou floral dip
6. Selektce transformantů na médiu se selektivními antibiotiky

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tisková**

Seznam doporučené literatury:

1. Tang Y, Dong Q, Wang T, Gong L, Gu Y. PNET2 is a component of the plant nuclear lamina and is required for proper genome organization and activity. *Dev Cell*. 2022 Jan 10;57(1):19-31.e6. doi: 10.1016/j.devcel.2021.11.002. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34822788
2. Wang X, Wang L, Huang Y, Deng Z, Li C, Zhang J, Zheng M, Yan S. A plant-specific module for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Apr 19;119(16):e2202970119. doi: 10.1073/pnas.2202970119. Epub 2022 Apr 11. PMID: 35412914; PMCID: PMC9169791
3. Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc* 1: 641-646
4. Prochazkova K, Finke A, Dvořák Tomaštková E, Fló J, Bente H, Dvořák P, Ovečka M, Šamaj J, Pečinka A (2022) Zebrulaine induces enzymatic DNA-protein crosslinks in 45S rDNA heterochromatin of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/NAR/GKAB1218

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

Datum završení bakalářské práce: 21. března 2022  
Termín odevzдания bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

---

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

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 29. března 2022



# BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

**Jméno a příjmení autora:** Kateřina Šléglová

**Název práce:** Příprava plasmidových konstruktů WSS1A a STUbL2 pro studium interaktorů u *Arabidopsis thaliana*

**Typ práce:** Bakalářská

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

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

**Rok obhajoby práce:** 2023

## Abstrakt:

DNA-proteinové crosslinky jsou jedno z neškodlivějších DNA poškození a pokud nedojde k jejich včasné opravě, může dojít k narušení buněčných procesů a následnému ohrožení životaschopnosti buněk. Proto si organismy vytvořily hned několik specializovaných opravných drah. Právě proteiny WSS1A a STUbL2 jsou spojeny s opravami DNA-proteinových crosslinků, ale jejich mechanismus u rostlin zatím nebyl dostatečně prozkoumán. Pro lepší pochopení opravných mechanismů je třeba najít nové proteiny, které se na nich spolupodílejí.

Pro sledování proteinových interakcí byla nedávno vyvinuta nová metoda tzv. proximity labeling, která umožňuje pomocí vybraných enzymů modifikovat proteiny interagující s vybraným studovaným proteinem nebo ležící v jeho blízkosti. Jedním takovým enzymem je i TurboID. Označené proteiny se následně dají purifikovat a analyzovat např. pomocí hmotnostní spektrometrie. Takto je možné např. identifikovat nové interaktory kandidátních proteinů. Díky tomu lze získat nové informace sloužící k bližšímu pochopení opravných mechanismů DNA-proteinových crosslinků u rostlin.

Pomocí Gateway technologie klonování byly vytvořeny konstrukty nesoucí kódující sekvenci genu WSS1A a TurboID tag. Tyto konstrukty byly transformovány do rostlin *Arabidopsis thaliana* a byly vyselektovány transgenní rostliny obsahující vložený konstrukt. Tyto budou dále sloužit pro následnou analýzu interaktorů WSS1A pomocí TurboID afinitní purifikace.

**Klíčová slova:** *Arabidopsis thaliana*, DNA-proteinové crosslinky, WSS1A, STUbL2, TurboID

**Počet stran:** 45

**Počet příloh:** 7

**Jazyk:** český

## **BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION**

**Author's first name and surname:** Kateřina Šléglová

**Title:** Cloning of plasmid STUbL2 and WSS1A constructs to study interactors in *Arabidopsis thaliana*

**Type of thesis:** Bachelor

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

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

**The year of presentation:** 2023

### **Abstract:**

DNA-protein crosslinks are one of the most harmful types of DNA damage, and if they are not repaired in time, cellular processes may be disrupted and cell viability may be threatened. Therefore, organisms have created several specialized repair pathways. It is the WSS1A and STUbL2 proteins that are associated with the repair of DNA-protein crosslinks, but their mechanism has not been sufficiently explored in plants yet. To better understand the repair mechanisms, we need to find new proteins, that are involved.

To identify protein-protein interactions, a new method called proximity labeling has recently been developed, which allows using enzymes to identify proteins interacting with the protein of interest or proteins in the vicinity of it. For example, TurboID is one of the enzymes that are used for proximity labeling method. Such labeled proteins can be purified and further analysed. Therefore, new information can be obtained, for example for better understanding of the repair mechanisms of DNA-protein crosslinks in plants.

Using Gateway cloning technology, constructs carrying the coding sequence of the *WSS1A* gene and the TurboID tag were generated. These constructs were transformed into *Arabidopsis thaliana* plants and transgenic plants containing the inserted construct were selected. These will be further used for subsequent analysis of WSS1A proximal interactome by TurboID affinity purification.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, DNA-protein crosslinks, WSS1A, STUbL2, TurboID

**Number of pages:** 45

**Number of appendices:** 7

**Language:** Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Příprava plasmidových konstruktů WSS1A a STUbL2 pro afinitní purifikaci TurboID u *Arabidopsis thaliana* vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Evy Dvořák Tomáškové, Ph.D. a za použití uvedené literatury.

V Olomouci:.....

Podpis:.....

Tímto bych chtěla vyjádřit velké poděkování Mgr. Evě Dvořák Tomašíkové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady, a především za dávku trpělivosti, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat celé vědecké skupině doc. Mgr. Aleše Pečinky, Ph.D za vytvoření příjemného pracovního prostředí a vstřícný přístup.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	CÍLE PRÁCE .....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
3.1	Huseniček rolní ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) .....	3
3.1	Poškození DNA .....	4
3.2	DNA–proteinové crosslinky .....	5
3.2.1	Typy DNA-proteinových crosslinků .....	5
3.2.2	Opravy DNA-proteinových crosslinků.....	7
3.3	Weak suppresor of SMT protein 1 (WSS1A).....	10
3.4	SUMO – targeted ubiquitin E3 ligáza (STUbL2).....	11
3.5	Studium protein – proteinových interakcí .....	11
3.2	Proximity labeling značení .....	12
3.2.1	Turbo-ID afinitní purifikace .....	13
4	MATERIÁL A METODY .....	15
4.1	Biologický materiál .....	15
4.1.1	Rostliny .....	15
4.1.2	Bakterie .....	15
4.1.3	Vektory .....	15
4.2	Použité chem ikálie, soupravy a roztoky .....	16
4.2.1	Použité chemikálie.....	16
4.2.2	Použité soupravy .....	16
4.2.3	Použité roztoky a jejich příprava .....	16
4.2.4	Použité primery .....	17
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení .....	18
4.3.1	Přístroje a zařízení .....	18
4.3.2	Programy .....	18
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací metody .....	19

4.4.1	Izolace gDNA.....	19
4.4.2	Měření koncentrace a vyhodnocení čistoty izolované nukleové kyseliny.....	19
4.4.3	Polymerázová řetězcová reakce .....	19
4.4.4	Agarózová gelová elektroforéza.....	21
4.4.5	Izolace a purifikace PCR produktu z gelu .....	21
4.4.6	MultiSite Gateway klonování.....	21
4.4.7	Transformace bakterií <i>E. coli</i> .....	24
4.4.8	Izolace plasmidů.....	24
4.4.9	Kontrola pomocí Sangerova sekvenování .....	24
4.4.10	Transformace bakterií <i>A. tumefaciens</i> .....	25
4.4.11	Transformace rostlin <i>A. thaliana</i> .....	25
4.4.12	Ověření přítomnosti konstruktů v T <sub>1</sub> generaci rostlin.....	26
5	VÝSLEDKY .....	27
5.1	Amplifikace genů <i>WSSIA</i> a <i>STUbL2</i> a izolace fragmentů z agarózového gelu .....	27
5.2	Příprava vstupních klonů pomocí BP reakce.....	28
5.2.1	Ověření správnosti konstruktů pomocí colony PCR a Sangerova sekvenování .....	28
5.3	Příprava expresních klonů pomocí LR reakce.....	29
5.3.1	Ověření správnosti konstruktů pomocí colony PCR a Sangerova sekvenování .....	29
5.4	Transformace a ověření bakterií <i>A. tumefaciens</i> .....	30
5.5	Transformace <i>A. thaliana</i> a selekce transformantů na médiu se selekčními antibiotiky .....	32
6	DISKUSE .....	34
7	ZÁVĚR.....	37
8	LITERATURA .....	38

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

APEX	Asorbát peroxidáza (z anglického „Ascorbate peroxidase“)
AP-MS	Afinitní purifikace v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (z anglického „Affinity purification Mass spectrometry“)
BER	Bázová excizní oprava (z anglického „base excision repair“)
BioID	Z anglického „Proximity-dependent biotin identification“
co-IP	Ko-imunoprecipitace
CPT	Kamptotecin
DDI1	Z anglického „DNA damage inducible 1 protease“
DPC	DNA-protein crosslink
DSB	Dvouvláknové zlomy (z anglického „Double-strand break“)
EME1	Z anglického „Essential meiotic endonuclease 1“
Eto	Etoposid
IR	Ionizující záření
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonát
MRE11	Z anglického „Meiotic recombination endonuclease 11“
MS	Hmotnostní spektrometrie (z anglického „Mass spectrometry“)
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
MUS81	Methylmethansulfonát, UV senzitivní protein 81 (z anglického „Methyl methanesulfonate and UV sensitive protein 81“)
NSE	Z anglického „Non-SMC element“
PAH	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PARP1	Poly(ADP-ribóza) polymeráza 1
PL	Z anglického „Proximity labeling“
PNKP	Polynukleotid kináza-fosfatáza

Polβ	DNA polymeráza beta
PPI	Proteinové interakce (z anglického „Protein-protein interactions“)
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SIM	Z anglického „SUMO interacting motifs“
SLD	Domény podobné SUMO (z anglického „SUMO-like domains“)
SMC5/6	Komplex strukturní údržby chromozomů 5/6 (z anglického „Structural maintenance of chromosomes 5/6“)
SPRTN	Metaloproteáza Spartan (z anglického „SprT-Like N-Terminal Domain“)
SSB	Jednovláknový zlom (z anglického „Single strand break“)
STUbL	Z anglického „SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase“
SUMO	Malý modifikátor podobný ubiquitinu (z anglického „Small ubiquitin-like modifier“)
TDP1	Tyrosyl-DNA fosfodiesteráza 1
TOP1	Topoizomeráza 1
TOP2	Topoizomeráza 2
UPP	Ubiquitin-proteasomový systém
UV	Ultrafialové záření
WSS1	Z anglického „Weak suppressor of SMT protein 1“
Y2H	Kvasinkový dvouhybridový systém (z anglického „Yeast two hybrid“)
ZEB	Zebularin



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Životní cyklus <i>A. thaliana</i> a jeho morfologie.....	3
<b>Obrázek 2:</b> Typy DNA poškození a látky, které je způsobují. ....	4
<b>Obrázek 3:</b> Typy DNA-proteinových crosslinků. ....	7
<b>Obrázek 4:</b> Mechanismy oprav DNA-proteinových crosslinků.....	10
<b>Obrázek 5:</b> Mechanismus TurboID proximity labelingu. ....	14
<b>Obrázek 6:</b> Schéma BP reakce. ....	22
<b>Obrázek 7:</b> Schéma LR reakce.....	22
<b>Obrázek 8:</b> Elektroforetické vyhodnocení PCR amplifikace produktů <i>WSS1A</i> a <i>STUbl2</i> .....	27
<b>Obrázek 9:</b> Elektroforetické vyhodnocení colony PCR testovaných na přítomnost konstruktů pDONR P4r-P2: <i>STUbl2</i> a pDONR P1-P4: <i>WSS1A</i> v <i>E. coli</i> .....	28
<b>Obrázek 10:</b> Elektroforetické vyhodnocení colony PCR testovaných na přítomnost konstruktů pK2GW7.0: <i>WSS1A</i> :TurboID HA v <i>E. coli</i> .....	30
<b>Obrázek 11:</b> Elektroforetické vyhodnocení colony PCR testovaných na přítomnost konstruktů pK2GW7.0: <i>WSS1A</i> :TurboID HA v <i>A. tumefaciens</i> .....	31
<b>Obrázek 12:</b> Selektce transformantů na médiu se selekčními antibiotiky. ....	32
<b>Obrázek 13:</b> Transformované rostliny <i>A. thaliana</i> . ....	33

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Seznam použitých vektorů.....	15
<b>Tabulka 2:</b> Seznam primerů určených pro PCR amplifikaci a Sangerovo sekvenování.....	17
<b>Tabulka 3:</b> Složení PCR reakční směsi pro amplifikaci inzertů. ....	19
<b>Tabulka 4:</b> Časový a teplotní profil PCR amplifikace inzertů. ....	20
<b>Tabulka 5:</b> Složení reakční směsi pro colony PCR.....	20
<b>Tabulka 6:</b> Časový a teplotní profil colony PCR. ....	20
<b>Tabulka 7:</b> Složení reakční směsi pro BP reakci. ....	23
<b>Tabulka 8:</b> Složení reakční směsi pro LR reakci. ....	23
<b>Tabulka 9:</b> Požadavky pro sekvenování plasmidu s vlastními primery.....	25
<b>Tabulka 10:</b> Získané koncentrace amplifikovaných a extrahovaných fragmentů.....	27
<b>Tabulka 11:</b> Získané koncentrace plasmidových konstruktů pDONR P1-P4:WSS1A (C fúze).....	29
<b>Tabulka 12:</b> Získané koncentrace plasmidových konstruktů pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA.....	30

## SEZNAM PŘÍLOH

**Příloha 1:** Mapa pENTR P1-P4:WSSIA.

**Příloha 2:** Mapa pENTR P4r-P2:STUBL2.

**Příloha 3:** Mapa pENTR P1-P4:WSSIA:TurboID.

**Příloha 4:** Srovnání sekvence pENTR P1-P4:WSSIA s výsledkem ze sekvenování kolonie 2 s insertem pENTR P1-P4:WSSIA (forward primer).

**Příloha 5:** Srovnání sekvence pENTR P1-P4:WSSIA s výsledkem ze sekvenování kolonie 2 s insertem pENTR P1-P4:WSSIA (reverse primer).

**Příloha 6:** Srovnání sekvence pENTR P1-P4:WSSIA s výsledkem ze sekvenování kolonie 5 s insertem pENTR P1-P4:WSSIA (forward primer).

**Příloha 7:** Srovnání sekvence pENTR P1-P4:WSSIA s výsledkem ze sekvenování kolonie 5 s insertem pENTR P1-P4:WSSIA (reverse primer).

# 1 ÚVOD

Integrita DNA, jakožto nositelky genetické informace, je velmi důležitá pro životaschopnost buněk a celého organismu. DNA je ovšem neustále vystavována různým endogenním a exogenním činidlům, kteří ji poškozují a narušují její integritu. Jedním z velmi častých a nebezpečných poškození DNA jsou také DNA-proteinové crosslinky, kdy vzniká kovalentní vazba mezi proteinem a DNA. DNA-proteinové crosslinky tvoří velmi objemné adukty a jejich přítomnost na DNA může ohrozit průběh některých esenciálních buněčných procesů, jako je například buněčné dělení, transkripce nebo replikace, což může mít pro organismus tragické následky. Aby k tomuto nedocházelo, je třeba DNA-proteinové crosslinky odstranit. Proto si organismy vytvořily hned několik specializovaných opravných mechanismů.

Jedním z opravných mechanismů je proteolytická degradace, při které dochází k odstranění proteinové části crosslinku. Enzym účastnící se tohoto typu oprav je metaloproteáza WSS1, avšak tento mechanismus u rostlin nebyl ještě zcela objasněn. Kromě toho se u rostlin spekuluje o úloze STUbl2 při opravách DNA-proteinových crosslinků v rámci úplně nového mechanismu. Ani tento rostlinný mechanismus však nebyl zatím objasněn.

Díky studiu protein-proteinových interakcí můžeme získat nové informace o těchto proteinech a zároveň tak objasnit opravné mechanismy. K tomu lze využít metodu proximity labeling značení. Jedná se o poměrně novou metodu studia interakcí mezi proteiny, která využívá různých katalytických enzymů. Tyto enzymy jsou spojeny se studovaným proteinem a po přidání vhodného substrátu připojují molekuly substrátu na proteiny interagující s proteinem studovaným nebo ležícím v jeho blízkosti. Substrátem značené proteiny lze následně purifikovat a dále analyzovat.

## 2 CÍLE PRÁCE

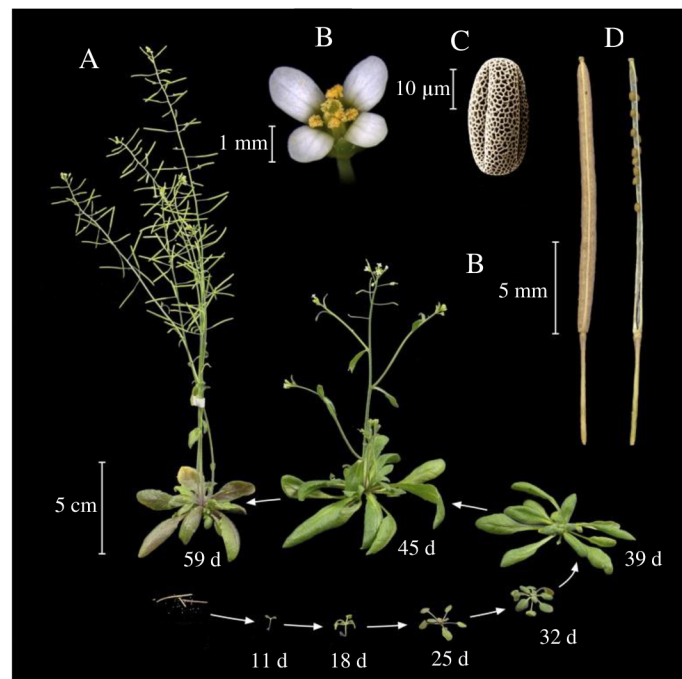
- Prostudování dostupných literárních zdrojů.
- Vypracování literární rešerše na téma bakalářské práce.
- PCR amplifikace, gelová elektroforéza a purifikace PCR produktů.
- Klonování pomocí Gateway strategie, transformace *E. coli*, colony PCR.
- Extrakce plasmidů, jejich ověření Sangerovým sekvenováním.
- Transformace binárních plasmidů do *A. tumefaciens*.
- Transformace rostlin *A. thaliana* metodou floral dip.
- Selektce transformantů na médiu se selekčními antibiotiky.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

Huseníček rolní je rostlina patřící do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Jedná se o jednoletou nebo ozimou bylinu menšího vzrůstu. Má přímou, často větvenou lodyhu, listy rostoucí v přízemní růžici a květy v hroznovitém uspořádání s bílými korunními lístky. Plod vytváří morfologické uspořádání šešule. Roste jako plevel převážně na skalnatých a kamenitých svazích, polích nebo na okrajích cest v bohatých populacích (Raven *et al.*, 2013).

Jedná se o první rostlinu, která byla vybrána jakožto modelový organismus pro studium rostlinné molekulární genetiky, a to hned z několika důvodů. Hlavním důvodem je její krátká generační doba. Ta trvá v průměru šest týdnů a každá rostlina je schopna vyprodukovat více než 10 000 nových semen. Dalším důvodem je její malá velikost, jež umožňuje pěstovat velké množství rostlin v poměrně malém prostoru. Pro huseníček je typická jeho samosprašnost. Velmi důležitý je především jeho relativně malý genom, který je kompletně osekvenovaný. Jeho velikost je 125 Mbp a je tvořen pěti chromozomy, na kterých se nachází kolem 27 000 genů (Cheng *et al.*, 2017).



**Obrázek 1:** Životní cyklus *A. thaliana* a jeho morfologie.

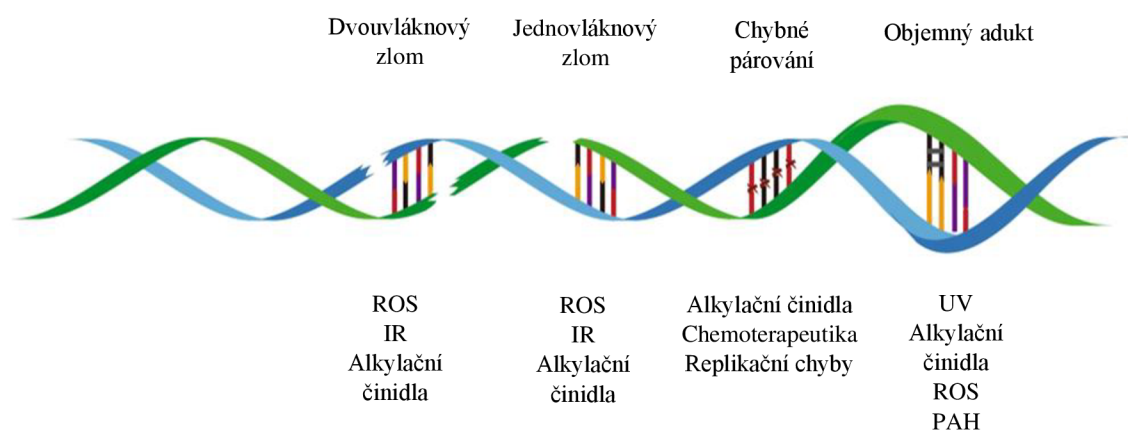
(A) *A. thaliana* v různých fázích životního cyklu. (B) Detail květu. (C) Detail pylového zrna. (D) Detail šešule se semeny (převzato z Krämer, 2015).

### 3.1 Poškození DNA

DNA je zdrojem genetické informace a ke správnému udržení života jakéhokoliv organismu je třeba zachovat její integritu. Integrita je ovšem neustále narušována různými faktory a v důsledku jejich působení může docházet k poškození DNA, jako jsou například abazická místa, chybně spárované báze, crosslinky nebo jednovláknové (SSB) či dvouvláknové zlomy DNA (DSB) (Carusillo *et al.*, 2020; Tuteja *et al.*, 2001). Poškození DNA může způsobit změnu sekvence nukleotidů a vést tak k expresi nefunkčních proteinů, které následně mohou ovlivnit normální buněčnou fyziologii (Srinivas *et al.*, 2019). Pokud poškození DNA není závažné, dochází ke zpomalení nebo zástavě buněčného cyklu tak, aby buňka získala čas pro opravu poškození. Při složitějších poškozeních, jako jsou zlomy pak dochází k apoptóze, aby se předešlo rozšiřování poškozené DNA (Yoshiyama *et al.*, 2013).

Zdroje poškození mohou být buď endogenní nebo exogenní. Mezi endogenní zdroje lze zařadit například vedlejší produkty metabolismu jakožto reaktivní formy kyslíku (ROS) nebo dusíku (RNS). Mezi exogenní lze zařadit různé fyzikální faktory, mezi které patří ionizující (IR) nebo ultrafialové (UV) záření. Dále mezi ně patří některé chemické mutageny jako například alkylační látky, aromatické aminy, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a mnohé další (Chatterjee *et al.*, 2017).

V každé lidské buňce dochází denně k 10 000 poškození (Friedberg, 2019). Vzhledem k tomu, že jsou rostliny přisedlé organismy a nejsou schopny měnit polohu, dochází u nich k neustálému poškozování DNA (Boyko *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2002). Z tohoto důvodu si buňky vybudovaly komplexní mechanismy, které jsou schopné tato poškození identifikovat, monitorovat a následně opravovat (Carusillo *et al.*, 2020).



**Obrázek 2:** Typy DNA poškození a látky, které je způsobují.

Ve vrchní části jsou popsány některé typy poškození DNA. V dolní části jsou potom vypsány někteří činitelé, kteří mohou přispět ke vzniku těchto poškození (převzato a upraveno z Marconi *et al.*, 2020).

### 3.2 DNA–proteinové crosslinky

DNA–proteinové crosslinky (DPC) jsou jedním z typů poškození DNA. Interakce mezi DNA a proteiny je nedílnou součástí mnohých buněčných procesů, jako například buněčné dělení, transkripce nebo replikace. Všechny tyto interakce jsou ovšem dočasné a dynamické (Zhang *et al.*, 2020). Jakmile jsou buňky vystaveny působení chemikálií způsobujících DNA–proteinové crosslinky, může dojít ke vzniku kovalentní a ireverzibilní vazby mezi proteinem a DNA, a tak i k samotnému vzniku DPC (Ide *et al.*, 2018). DPC následně díky svojí nadměrné velikosti blokuje interakce mezi jinými proteiny a DNA a stávají se tak příčinou pro chybné fungování různých esenciálních buněčných procesů (Hacker *et al.*, 2020). DPC patří mezi jedny z nejvíce škodlivých poškození DNA (Sun *et al.*, 2020). První záznam o DPC v živých buňkách pochází z roku 1962 (Smith, 1962).

Stejně jako ostatní typy poškození DNA, i DPC vznikají působením endogenních nebo exogenních faktorů. Mezi endogenní patří např. reaktivní aldehydy, ROS nebo mohou vznikat také enzymaticky. Mezi exogenní faktory patří různé druhy záření (UV, IR) nebo chemické látky, např. mitomycin C (MMC), kamptotecin (CPT), etoposid (Eto), zebularin (ZEB), olaparib, veliparib, teniposid nebo cisplatin (Enderle, Dorn, *et Puchta*, 2019; Hacker *et al.*, 2020; Kojima *et Machida*, 2020).

#### 3.2.1 Typy DNA-proteinových crosslinků

DPC lze rozdělit do několika kategorií. Buďto je můžeme dělit na enzymatické a neenzymatické, na základě toho, jaký protein se účastní vazby na DNA (Zhang *et al.*, 2020). U neenzymatických DPC se na vazbě podílejí teoreticky jakýkoliv protein nacházející se v blízkosti DNA, na který působí některé z faktorů způsobujících tato poškození. U enzymatických DPC se kovalentní vazba na DNA vytváří mezi DNA a enzymy, které se se na DNA váží v průběhu svého normálního reakčního cyklu. Mnohé enzymatické reakce spojené s DNA totiž vytváří meziproduct, u nichž vzniká přechodná kovalentní vazba mezi DNA a enzymem. Působením faktorů způsobujících tvorbu DPC nedojde k odstranění přechodné vazby mezi enzymem a DNA a dojde tak ke vzniku enzymatického DPC (H. Zhang *et al.*, 2020) Dále lze DPC dělit do čtyř kategorií na základě přítomnosti a typu DNA zlomu přilehlému k DPC (Hacker *et al.*, 2020).

První typ DPC je jediný, který není spojený se zlomy DNA a místo toho se protein kovalentně váže na neporušené vlákno DNA. Jedná se o nejčastěji se vyskytující typ DPC, a zároveň také o jediný typ zahrnující enzymatické i neenzymatické DPC (Hacker *et al.*, 2020; Ide *et al.*, 2018; H. Zhang *et al.*, 2020). Mezi zdroje způsobující první typ DPC lze zařadit UV a IR záření. Ty způsobují tvorbu volných radikálů uvnitř molekul DNA a proteinů, které následně stojí za interakcemi mezi proteinem a DNA, a taktéž stojí za tvorbou kovalentní vazby (Barker *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2017). Dalšími zdroji mohou být reaktivní aldehydy nebo ROS vznikající jako meziproducty různých metabolických procesů, mezi které patří fotosyntéza nebo demethylace histonů (Barker *et al.*, 2005; Hacker *et al.*, 2020).

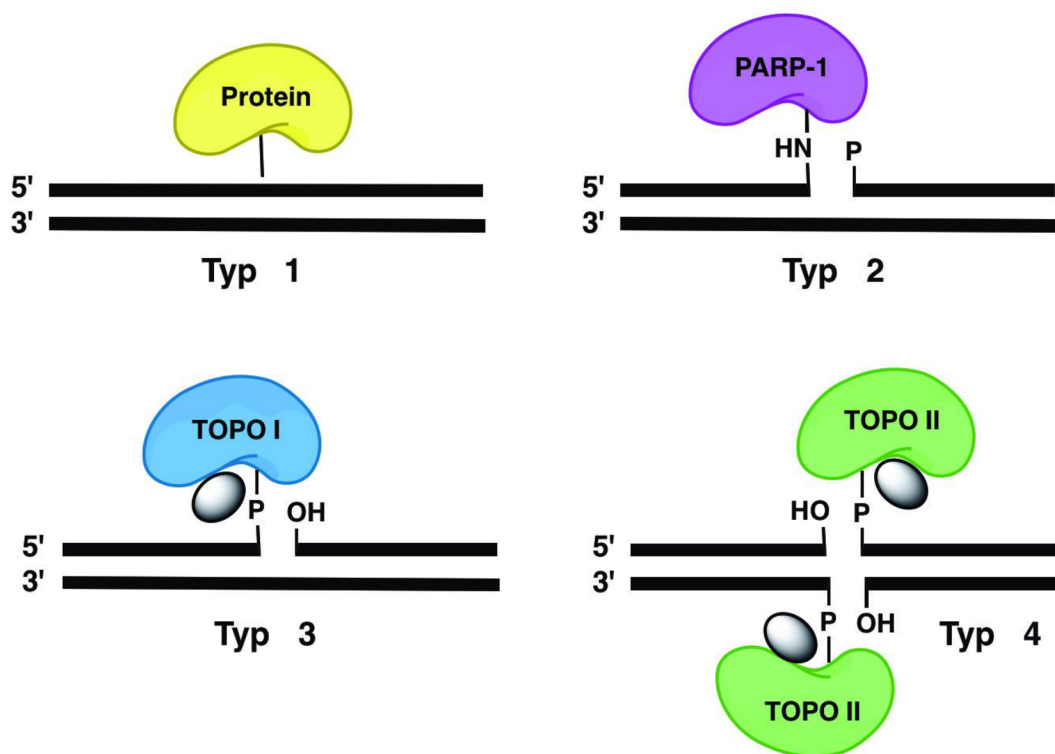


Chemické zdroje způsobující typ 1 DPC jsou např. formaldehyd, cisplatina nebo analogy cytozinu, jako jsou například zebularin nebo 5-azacytidin (Barker *et al.*, 2005; Kojima *et Machida*, 2020; Nowicka *et al.*, 2020; Prochazkova *et al.*, 2022).

DPC druhého typu se vyskytují v blízkosti abazických míst vznikajících během báзовých excizních oprav (BER) pomocí enzymu poly(ADP-ribóza) polymerázy 1 (PARP1) nebo DNA polymerázy  $\beta$  (Pol $\beta$ ) (Ide *et al.*, 2018). PARP1 DPC vznikají nejspíše jako Schiffovy báze na 3' konci DNA vlákna. Mohou vznikat spontánně na DNA v místech se zvýšenou koncentrací abazických míst (Khodyreva *et al.*, 2010). Vznik DPC s přítomností PARP1 je podporován působením alkylačních látek jako například methylmethansulfonát (MMS) (Prasad *et al.*, 2019). Další látky zapřičiňující vznik PARP1 DPC jsou olaparib, veliparib nebo MK4827. Tyto látky inhibují PARP1 a tím pádem enzym zůstává přichycený na DNA a vzniká tak DPC (Murai *et al.*, 2012). V případě Pol $\beta$  DPC se polemizuje o jeho významu vzhledem k tomu, že je známo příliš málo informací (Hacker *et al.*, 2020).

U DPC třetího a čtvrtého typu dochází k zachycení topoizomerázového komplexu na DNA. Takovéto DPC vznikají při procesech jako DNA replikace, rekombinace, transkripce nebo segregace chromozomů, kde je třeba nejprve pomocí topoizomeráz rozmotat a rozvolnit vlákna DNA (Hacker *et al.*, 2020; Ide *et al.*, 2018). DNA topoizomerázy jsou schopny rozvolnit DNA pomocí tvorby přechodných DNA zlomů. Topoizomerázy můžeme rozdělit na dva typy podle toho, jaký typ zlomu na DNA vytváří. Topoizomeráza 1 (TOP1) vytváří na DNA pouze SSB, kdežto Topoizomeráza 2 (TOP2) je schopna na DNA vytvořit DSB. Funkce obou topoizomeráz je závislá na aktivním tyrosylovém zbytku nacházejícím se v aktivním centru enzymu, díky kterému mají topoizomerázy schopnost napadnout fosfát DNA páteře reverzibilním způsobem. V některých případech může být meziproduct ireverzibilně kovalentně navázán na DNA a tím může dojít ke vzniku DPC. Ireverzibilní vazba může vzniknout spontánně nebo při působení chemických látek, jako jsou například etoposid nebo teniposid (Hacker *et al.*, 2020; Wang, 2002). Kromě toho je vznik těchto typů DPC podporován přítomností abazických míst, chybně spárovaných bází, SSB nebo DSB (Connelly *et Leach*, 2004).

Ačkoliv je původ DPC třetího a čtvrtého typu velmi podobný, složení komplexů je po chemické stránce naopak velmi rozlišné, a tak se liší i jejich vliv na samotnou integritu genomu. U třetího typu DPC je TOP1 zachycena k DNA pomocí tyrosyl-fosfodiesterové vazby na 3' konci SSB. Oproti tomu u čtvrtého typu DPC je TOP2 zachycena k DNA pomocí dvou tyrosyl fosfodiesterových vazeb na obou 5' koncích DSB (Wang 1996). Z tohoto pohledu způsobují DPC čtvrtého typu mnohem toxičtější poškození DNA než DPC třetího typu (Hacker *et al.*, 2020).



**Obrázek 3:** Typy DNA-proteinových crosslinků.

Typ 1 představuje protein kovalentně navázaný na nepoškozenou DNA. Typ 2 zahrnuje PARP1, která je připojená ke 3' konci SSB na DNA. U typu 3 je TOP1 připojená pomocí tyrosyl-fosfodisterové vazby ke 3' konci SSB na DNA. U typu 4 je TOP2 připojená pomocí tyrosyl-fosfodiesterových vazeb ke 5' koncům DSB na DNA (převzato a upraveno z Ide *et al.*, 2015).

### 3.2.2 Opravy DNA-proteinových crosslinků

Jak již bylo zmíněno, DPC patří mezi jedno z nejzávažnějších poškození DNA a jejich následky mohou být pro integritu genomu a následně i pro životaschopnost buněk a celého organismu velmi zásadní. Proto si organismy vytvořily hned několik specializovaných opravných mechanismů, které jsou schopny vyhledat DPC a následně jej odstranit. Je známo, že byly vyvinuty alespoň tři na sobě nezávislé mechanismy specializované na opravu DPC. Jedná se o endonukleotické štěpení, proteolytickou degradaci a enzymatickou hydrolýzu (Enderle, Dorn, Beying, *et al.*, 2019; Hacker *et al.*, 2020). Nově byl nalezen i čtvrtý mechanismus využívající komplex SMC5/6 (Dvořák Tomašítková *et al.*, 2023).

Endonukleotické štěpení DPC u rostlin je prvním zmíněným mechanismem oprav DPC. Hlavním činitelem tohoto mechanismu je endonukleáza Methyl methanosulfonate and UV sensitive protein 81 (MUS81), která se specificky zaměřuje na DNA část DPC (Enderle, Dorn, Beying, *et al.*, 2019). MUS81 tvoří společně s Essential meiotic endonuclease 1 (EME1) heterodimerní komplex, který katalyzuje štěpení různých DNA meziproductů (Geuting *et al.*, 2009). Jedná se například o zastavené replikační vidličky, Hollidayovy spoje nebo D-smyčky (Doe *et al.*, 2002; Gaillard *et al.*,

2003; Mannuss *et al.*, 2010). Specifický mechanismus, kterým se komplex MUS81-EME1 vyrovnává s těmito produkty se nazývá nick-counterneck. Při tomto procesu komplex symetricky štěpí obě vlákna DNA (Gaillard *et al.*, 2003). Tím dochází ke vzniku DSB, což ovšem následně vyžaduje další opravné cesty, jako je homologní rekombinace nebo regrese replikační vidličky. Mechanismus MUS81 tedy pravděpodobně nespočívá v přímém odstranění DPC. Přesný mechanismus však není úplně znám (Regairaz *et al.*, 2011). Je dokázáno, že rostliny s nedostatkem MUS81 vykazují zvýšenou citlivost vůči některým látkám způsobujícím DPC, například MMC, CPT nebo cisplatina. Dále je dokázáno, že MUS81 se účastní oprav DPC prvního a třetího typu. Zda se účastní i oprav ostatních typů DPC zatím není známo (Enderle, Dorn, Beying, *et al.*, 2019; Regairaz *et al.*, 2011). Další endonukleáza, která by mohla hrát roli při opravách DPC u rostlin je Meiotic recombination endonuclease 11 (MRE11), která je součástí tzv. MRN-komplexu (Williams *et al.*, 2007). O tomto komplexu je známo, že se účastní oprav DBS a je dokonce dokázáno, že se účastní oprav DPC u hub, bakterií a savců. Role při opravách DPC u rostlin však zatím není potvrzena (Hacker *et al.*, 2020; Stingele *et al.*, 2017; Williams *et al.*, 2007).

Proteolytická degradace DPC je dalším z opravných mechanismů DPC. Ta probíhá pomocí metaloproteázy Weak suppresor of SMT protein 1 (WSS1). WSS1 specificky degraduje proteinovou část DPC mechanismem spojeným s replikací DNA (Stingele *et al.*, 2014). Bylo experimentálně dokázáno, že k proteolýze proteinové části DPC je potřeba jednovláknová DNA. Dvouvláknová DNA totiž vede k vystřížení samotné proteázy. Po proteolýze proteinové části DPC zůstává na DNA napojený ještě malý peptidový zbytek (Stingele *et al.*, 2016). Tento peptidový zbytek je později odstraněn při syntéze translézi (Duxin *et al.*, 2014). Je ovšem nutné, aby byla proteáza kontrolována mechanismy, díky kterým jsou následně odstraněny pouze proteiny s kovalentní vazbou k DNA. Pokud by proteáza degradovala i nekovalentně spojené proteiny, mohlo by dojít k velmi škodlivým následkům. Jedním z kontrolních mechanismů je tzv. ubiquitin switch, při kterém dochází k deubiquitinaci WSS1 pomocí zatím neznámého mechanismu. Tato deubiquitinace následně umožňuje lokalizovat WSS1 na místo určení. V další úrovni kontroly je třeba, aby proteáza WSS1 byla proteolyticky aktivní (Stingele *et al.*, 2016). U savců je stejná funkce WSS1 nahrazena proteázou Spartan (SPRTN) (Stingele *et al.*, 2015). Jednodomé rostliny obsahují WSS1 s homology WSS1A a WSS1B. *Arabidopsis thaliana*, stejně jako ostatní dvoudomé rostliny, disponuje dvěma homology WSS1A a WSS1B, ale bylo prokázáno, že pouze homolog WSS1A se účastní oprav DPC. (Enderle, Dorn, Beying, *et al.*, 2019). Podrobnějším popisem proteinu WSS1A se zabývá kapitola 3.4. Další proteáza, která by mohla hrát svoji roli při opravách DPC je DNA damage inducible 1 proteáza (DDI1). Ta byla zatím popsána u kvasinek a savců, ale předpokládá se, že by mohla být spojena s opravnými procesy i v rostlinné říši. Tento předpoklad však zatím nebyl prokázán (Koizumi *et al.*, 2016; Trempe *et al.*, 2016).

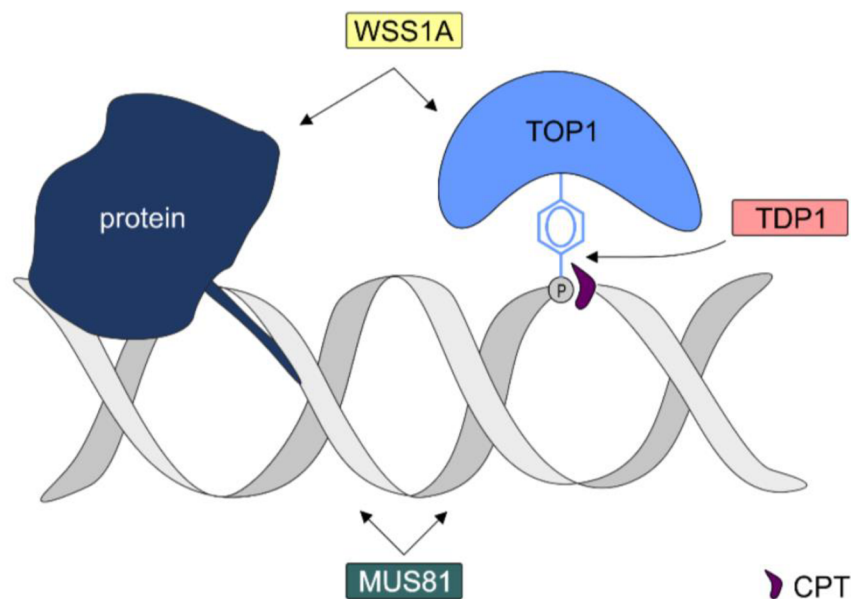
Posledním zmíněným mechanismem oprav DPC u rostlin je enzymatická hydrolýza. Ta cílí na vazbu mezi proteinem a DNA. Enzym účastnící se tohoto typu oprav se jmenuje Tyrosyl-DNA

fosfodiesteráza 1 (TDP1). Jedná se o specializovaný enzym schopný hydrolyzovat adukty na 3' konci DNA. TDP1 se u rostlin účastní oprav DPC třetího typu (Pommier *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2019). Konkrétně slouží spíše jako záložní plán pro opravu třetího typu DPC (Enderle, Dorn, Beying, *et al.*, 2019). Mechanismus spočívá v tom, že TDP1 je schopen hydrolyzovat fosfodiesterovou vazbu mezi 3' fosfátem DNA kostry a aktivním tyrosylovým zbytkem TOP1 (Pouliot *et al.*, 1999). Vzhledem k tomu, že vazba je díky velikosti TOP1 pro enzym nepřístupná, předchází samotné hydrolyze vazby ještě částečná degradace proteinové části pomocí proteasomu (Debéthune *et al.*, 2002; Interthal *et Champoux*, 2011). Po hydrolyze vazby zůstává na 3' konci DNA fosfát, který je následně pomocí Polynukleotid kinázy-fosfatázy (PNKP) odstraněn a vlákno DNA je zaceleno pomocí BER (Plo *et al.*, 2003).

Dalším specializovaným enzymem, který by se potenciálně mohl účastnit oprav DPC u rostlin je Tyrosyl-DNA fosfodiesteráza 2 (TDP2). Ta byla objevena u obratlovců a účastní se oprav DPC u třetího a čtvrtého typu (Zeng *et al.*, 2011). U rostlin byly objeveny tři homologní izoformy lidského TDP2. U *A. thaliana* se ovšem vyskytuje pouze jedna z těchto forem, TDP2 $\alpha$ . Předpokládá se, že by její funkce mohla také spočívat v opravách DPC, ale to zatím nebylo potvrzeno (Confalonieri *et al.*, 2014; Hacker *et al.*, 2020).

Nově bylo navíc prokázáno, že Structural maintenance of chromosomes 5/6 komplex (SMC5/6) se také účastní oprav DPC (Dvořák Tomaščíková *et al.*, 2023). Tento komplex se skládá z prstencové struktury SMC5 a SMC6 heterodimerů a několika Non-SMC elementů (NSE). Podjednotka NSE2 představující E3 SUMO-ligázu zprostředkovává SUMOylaci poškozených míst na která se následně vážou proteiny SUMO-targeted ubiquitin ligázy (STUbL) pomocí SUMO interagujících motivů (SIM) (Whalen *et al.*, 2020). Přesný mechanismus ještě není zcela znám. Genom *A. thaliana* kóduje dvě podjednotky SMC6, jednu podjednotku SMC5 a šest podjednotek NSE. Konkrétně se komplex SMC5/6 účastní oprav DPC třetího a čtvrtého typu, a ve spolupráci s WSS1A a MUS81 se účastní oprav DPC zprostředkovaných zebularinem (Dvořák Tomaščíková *et al.*, 2023).

Z toho tedy vyplývá, že u *A. thaliana* existují alespoň čtyři opravné cesty, kdy každá cílí na jinou část DPC. V případě endonukleotického štěpení enzym MUS81 cílí na DNA část u enzymatických i neenzymatických DPC. U proteolytické degradace protein WSS1A cílí na proteinovou část DPC taktéž u enzymatických i neenzymatických DPC. Při enzymatické hydrolyze enzym TPD1 cílí na tyrosil-fosfodiesterázovou vazbu zachycené TOP1. Enzymatická hydrolyza se tedy uplatňuje pouze u enzymatických DPC, a to konkrétně u třetího typu (Enderle, Dorn, *et Puchta*, 2019). SMC5/6 komplex se na opravách podílí nezávisle na těchto třech drahách, pravděpodobně SUMOylaci DPC nebo proteinů, které se na DPC váží a přímo zprostředkovávají jeho opravu (Dvořák Tomaščíková *et al.*, 2023).



**Obrázek 4:** Mechanismy oprav DNA-proteinových crosslinků.

DNA-proteinový crosslink lze opravit hned třemi na sobě nezávislými mechanismy, kdy každý z nich cílí na jinou část. Prvním mechanismem je endonukleotické štěpení pomocí MUS81, která cílí na DNA. Druhý mechanismus představuje proteolytickou degradaci proteinové části pomocí WSS1A. Třetím mechanismem je enzymatická hydrolyza vazby mezi proteinem a DNA pomocí TDP1 (převzato a upraveno z Enderle, Dorn, *et Puchta*, 2019).

### 3.3 Weak suppressor of SMT protein 1 (WSS1A)

Jak již bylo řečeno, jednu ze tří opravných mechanismů DPC u rostlin představuje tzv. proteolytická degradace proteinové části DPC. Tohoto mechanismu se účastní metaloproteáza Wss1 nebo její homolog SPRTN vyskytující se u savců. SPRTN je vzdáleně příbuzný proteinu WSS1. Mají stejnou doménovou organizaci a evoluční původ (Stingele *et al.*, 2015, 2016). Je dokázáno, že myši s nedostatkem SPRTN jsou embryonálně letální a hypomorfní mutantní jedinci vykazují znaky předčasného stárnutí a genomové nestability (Maskey *et al.*, 2014).

U *A. thaliana* se oprav DPC účastní pouze jeden ze dvou přítomných homologů WSS1, a to WSS1A. WSS1A je pro rostlinu esenciální protein a podílí se na opravě jak neenzymatických (první typ DPC), tak některých enzymatických DPC. U enzymatických DPC se zabývá především opravou DPC s TOP1 (třetí typ DPC) (Enderle, Dorn, Beying, *et al.*, 2019). Mutanti *Atwss1A* vykazují specifický fenotyp s krátkými kořeny, sníženou plodností, ale naopak se zvýšenou citlivostí vůči některým látkám způsobujícím DPC, jako jsou např. cisplatina, CPT nebo Eto (Enderle, Dorn, Beying, *et al.*, 2019; Hacker *et al.*, 2020). Nedávno bylo také prokázáno, že v případě absence SMC5/6 komplexu, působí WSS1A při opravách DPC indukovaných zebularinem (Dvořák Tomaštková *et al.*, 2023). Tento mechanismus ale není podrobněji prostudován.

### 3.4 SUMO – targeted ubiquitin E3 ligáza (STUbL2)

Další protein, který by se mohl potenciálně účastnit oprav DPC u rostlin je SUMO-targeted Ubiquitin E3 ligáza 2 (STUbL2) (Augustine *et Vierstra*, 2018; Sun *et al.*, 2020). Ta patří do rodiny SUMO-targeted Ubiquitin ligáz, které selektivně ubiquitinují již sumoylované proteiny a proteiny obsahující domény podobné SUMO (SLD) (Prudden *et al.*, 2007). Proteiny označené ubiquitinem jsou následně odstraněny pomocí proteasomu. Mluvíme tak o ubiquitin-proteasomovém systému (UPP). Tato opravná cesta byla identifikována zatím u člověka a u kvasinek, kde takto dochází k opravám DPC třetího a čtvrtého typu (Sun *et al.*, 2020).

U *A. thaliana* bylo identifikováno šest typů STUbL (Elrouby *et al.*, 2013). Přesná funkce a mechanismus STUbL2 u rostlin ještě není přesně známa, ale spekuluje se o jeho spolupráci se Structural maintenance of chromosomes 5/6 komplexem (SMC5/6), který zabezpečuje genomovou stabilitu a hraje klíčovou roli při opravách DPC (Dvořák Tomašíková *et al.*, 2023).

### 3.5 Studium protein – proteinových interakcí

Interakce mezi proteiny (PPI) jsou nedílnou součástí všech esenciálních procesů v buňkách a jejich identifikace je velmi důležitá pro pochopení všech těchto mechanismů v buňkách (Yang *et al.*, 2021). Většina proteinů navíc nefunguje jako samostatná jednotka, ale pracuje ve formě komplexů (Berggård *et al.*, 2007). Existuje široká škála metod, jak interakce mezi proteiny pozorovat, a to specificky pro různé skupiny organismů (Y. Zhang *et al.*, 2009). U rostlin se jedná především o metody kvasinkový dvouhybridový systém (Y2H), afinitní purifikaci pomocí hmotnostního spektrometru (AP-MS) a ko-imunoprecipitaci (co-IP) v kombinaci s hmotnostním spektrometrem (MS). Tyto metody lze rozdělit ještě do dvou pomyslných skupin. Ty, které využívají hmotnostní spektrometr (co-IP a AP-MS) jsou schopny identifikovat interagující proteiny de novo. Na druhou stranu metoda Y2H se využívá jako potvrzovací metoda, při které se pouze potvrzuje, zda potenciální kandidátní protein nalezený pomocí MS opravdu interaguje se studovaným proteinem (Uhrig, 2006; Yang *et al.*, 2021; Y. Zhang *et al.*, 2009).

Metoda Y2H pracuje na principu toho, že mnoho eukaryotických transkripčních faktorů (např. kvasinkový enhancer Gal4) se skládá ze dvou funkčně odlišných domén, které zprostředkovávají transkripční aktivaci a vazbu na DNA (Berggård *et al.*, 2007). Studovaný protein (tzv. bait) je fúzovaný s DNA vazebnou doménou, zatímco jeho potenciální vazebný partner (tzv. prey) je fúzovaný s aktivační doménou. Interakce mezi těmito proteiny aktivuje reportérové geny, které způsobují barevnou reakci nebo umožňují růst na selekčním médiu (Brückner *et al.*, 2009). Výhody metody jsou její cena a relativně nízká náročnost (Berggård *et al.*, 2007). Mezi nevýhody naopak patří nespolehlivost v podobě vysoké míry falešně pozitivních výsledků, a tak se výsledky musí potvrzovat pomocí dalších metod (Y. Zhang

*et al.*, 2009). Další nevýhodou je to, že metoda se dá využít pouze za nefyziologických podmínek nebo za podmínek *in vitro* (Yang *et al.*, 2021).

AP-MS metoda zahrnuje kombinaci metody afinitní purifikace a hmotnostní spektrometrie (Van Leene *et al.*, 2008). Studovaný protein je pomocí ligandu navázán na pevný nosič (Roque *et al.*, 2007). Jako ligand se využívají především afinitní značky jako His-tag, FLAG-tag nebo TAP-tag (Y. Zhang *et al.*, 2009). Proteiny interagující se studovaným proteinem se následně izolují a zkoumají pomocí hmotnostní spektrometrie. Díky hmotnostní spektrometrii se dá vygenerovat seznam potenciálních proteinů, které interagují se studovaným proteinem (Gingras *et al.*, 2005; Yugandhar *et al.*, 2019). Výhodou této metody je možnost provádění za nativních podmínek. Další výhodou je možnost sledování dynamiky PPI, kdy lze sledovat tyto interakce při různých podmínkách (Gingras *et al.*, 2005; Van Leene *et al.*, 2008). Naopak nevýhodou této metody je stejně jako u Y2H její vysoká nespolehlivost a vysoká míra falešně pozitivních výsledků, proto je třeba výsledky potvrdit pomocí jiných metod. (Auerbach *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2009).

Metoda co-IP je založena na zachycení studovaného proteinu pomocí specifických protilátek na pevný nosič. Protilátky zároveň nespecificky zachycují i proteiny interagující se studovaným proteinem, právě pomocí PPI. Proteinové komplexy jsou následně izolovány a zkoumány pomocí MS nebo western blottingu (Berggård *et al.*, 2007; Masters, 2004). Nevýhodou této metody je však skutečnost, že ve většině případů nedokáže identifikovat slabé nebo přechodné PPI. Další nevýhodou je jejich využití pouze v případě nefyziologických podmínek nebo podmínek *in vitro* (Yang *et al.*, 2021).

Novinkou posledních let je tzv. proximity labeling značení, využívající různé enzymy, v kombinaci s MS. Více informací o metodách proximity labelingu je poskytnuto v následujících kapitolách.

### **3.2 Proximity labeling značení**

Proximity labeling značení (PL) je poměrně nová, avšak v dnešní době hojně využívaná metoda studia PPI díky svým výhodám oproti ostatním metodám. PL má schopnost zachytit nejen proteiny přímo interagující se studovaným proteinem, ale také zachycuje proteiny vyskytující se v blízkosti studovaného proteinu (Roux *et al.*, 2012; Trinkle-Mulcahy, 2019). Další výhodou PL je schopnost zachycení slabých, přechodných nebo hydrofobních PPI za nativních podmínek, což spousta metod pro studium PPI neumožňuje (Bosch *et al.*, 2021; Kerbler *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021). Využití PL se rozšiřuje do dalších oblastí než jen řešení topologie membrán nebo lokalizace a interakce proteinů. Může nalézt využití v případě identifikace genových regulátorů specifických pro daný lokus nebo v elektronové mikroskopii s vysokým rozlišením (Mair *et al.*, 2022).

Mechanismus PL metod spočívá ve využívání různých katalytických enzymů, které se spojí se studovaným proteinem, nebo dojde k jeho zakotvení do subcelulárního prostoru. Po přidání odpovídajícího substrátu začne enzym značit proteiny interagující se studovaným proteinem nebo

vyskytujícími se v jeho blízkosti, a to tak, že kovalentně naváže molekuly substrátu právě na tyto proteiny. Značené proteiny lze na základě afinitní purifikace pomocí streptavidinu izolovat a podrobit tandemové hmotnostní spektrometrii (MS/MS) (Xu *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021). Mezi dva nejvyužívanější PL systémy patří ty, které využívají modifikovanou formu *E. coli* biotin ligázy (BirA), jako je BioID a TurboID, nebo systémy využívající askorbát peroxidázu (APEX) (Bosch *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021).

APEX je monomerní askorbát peroxidáza o velikosti 27 kDa (Trinkle-Mulcahy, 2019; Xu *et al.*, 2021). APEX dokáže označit mapované proteiny pomocí biotin-fenolu za přítomnosti peroxidu vodíku (Rhee *et al.*, 2013). Optimální teplota při značení pomocí APEX by měla být 37 °C a doba značení se pohybuje okolo 1 min, což je oproti ostatním využívaným enzymům mnohem kratší doba. Právě díky krátké době značení se APEX hojně využívá při studiu dynamických procesů a přechodných PPI. Nevýhodou této metody je naopak využití biotin-fenolu a peroxidu, což jsou látky vyvolávající toxické účinky v buňkách a tkáních (Kerbler *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021).

Proximity-dependent biotin identification (BioID) pracuje pomocí enzymu BirA, který se stal asi nejvyužívanějším enzymem mezi metodami PL, a to především u rostlin. BirA je biotinová proteinová ligáza o velikosti 35 kDa, která zprostředkovává navázání biotinu na cílové proteiny (Choi-Rhee *et al.*, 2008; Roux *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2020). Optimální teplota pro značení pomocí BioID je stejná jako u APEX, tudíž 37 °C. Výhodou oproti APEX je využití netoxického biotinu jakožto substrátu, což eliminuje vznik oxidačních stresových podmínek pro buňky a tkáně (Lin *et al.*, 2017). Oproti tomu nevýhodou BioID je její délka značení, která se pohybuje okolo 18-24 h (Bosch *et al.*, 2021; Kerbler *et al.*, 2021).

Metoda PL je hojně využívána v systémech u savců a jednobuněčných eukaryot, ale jeho využití v rostlinné sféře je stále ve vývoji (Kerbler *et al.*, 2021). Avšak zatímco první experimenty využívající PL u rostlin vyžadovaly vysokou hladinu exprese a dlouhou dobu značení, dnes se setkáváme s enzymy, které jsou mnohem rychlejší a specifitější pro různé rostlinné typy, například TurboID (Mair *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2021). Více informací o metodě Turbo ID je rozepsáno v následující kapitole.

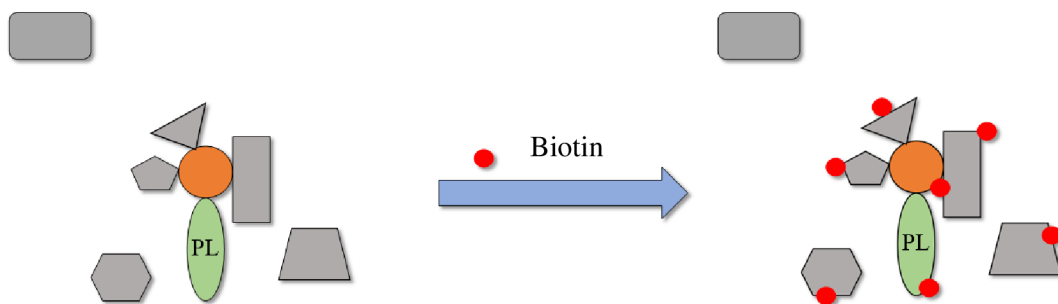
### 3.2.1 Turbo-ID afinitní purifikace

TurboID afinitní purifikace představuje další a zároveň jednu z nejnovějších forem studia PPI pomocí PL. Využívá stejně jako BioID biotin ligázu BirA, jen s tím rozdílem, že se jedná o její modifikovanou formu. Velikost enzymu, je stejně jako u BioID 35 kDa (Branon *et al.*, 2018). TurboID kombinuje výhody metod APEX a BioID a zároveň eliminuje jejich nevýhody. Využívá značení cílových proteinů pomocí netoxického biotinu, stejně jako u BioID. Navíc se délka značení u TurboID nepohybuje v řádech hodin jako u BioID, ale stačí jí doba okolo 10 minut. Kombinace těchto vlastností umožňuje poměrně rychle identifikovat i dynamické procesy v buňkách bez jejich poškození (Donelson



Smith *et al.*, 2018; Mair *et al.*, 2019). K tomu všemu je TurboID schopno pracovat už při pokojové teplotě na rozdíl od ostatních zmíněných metod, které potřebují teplotu 37 °C (Yang *et al.*, 2021; Y. Zhang *et al.*, 2020). Bylo dokázáno, že ve srovnání s BioID vykazuje TurboID vyšší účinnost při biotinylnaci cílových proteinů (Arora *et al.*, 2020; Y. Zhang *et al.*, 2019). Všechny tyto faktory přispěly k rozšíření metody TurboID od savčích buněk až do rostlinné sféry (Branon *et al.*, 2018; Y. Zhang *et al.*, 2019, Tang *et al.*, 2022).

Mechanismus TurboID afinitní purifikace spočívá v tom, že enzym biotin ligáza po přidání biotinu kovalentně naváže molekuly tohoto substrátu na cílové proteiny reagující se studovaným proteinem nebo na proteiny ležící v jeho blízkosti. Proteiny značené biotinem se následně izolují pomocí afinitní purifikace na bázi streptavidinu. Izolované proteiny lze dále studovat pomocí MS/MS (Yang *et al.*, 2021).



**Obrázek 5:** Mechanismus TurboID proximity labelingu.

Studovaný protein (označený oranžovou barvou) je spojen s TurboID enzymem (označený zeleně se značkou PL). TurboID po přidání substrátu biotinu (označený červeně) kovalentně váže molekuly biotinu na proteiny reagující se studovaným proteinem nebo s proteiny nacházející se v jeho blízkosti (označené šedou barvou) (převzato a upraveno z Yang *et al.*, 2021).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

#### 4.1.1 Rostliny

Pro experimenty byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* linie *Columbia-0* (wild-type, divoký typ) a mutantní linie *wss1a* a *stubl2*.

Semena rostlin byla vyseta do substrátu ošetřeného přípravkem Careo. Vysetá semena byla pěstována ve fytotronové komoře. Po vyklíčení semen bylo vybráno několik rostlin, které byly samostatně rozesazeny do substrátu ošetřeného přípravkem Careo. Takto připravené rostliny byly pěstovány ve fytotronové komoře, dokud nedošlo k růstu květů. Tyto rostliny byly použity k transformaci metodou floral dip. Po dozrání semen byly z rostlin odstříhány již vzniklé šesule se semeny.

#### 4.1.2 Bakterie

Pro experimenty byly použity bakterie *Escherichia coli* kmen STBL2 a TOP10, které byly kultivovány na LB médiu s přidavkem antibiotik podle selekčního markeru přítomného ve vloženém vektoru. Bakteriální kultury byly inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C v termostatu nebo v inkubované rotační třepače při 220 rpm.

Dále byly použity bakterie *Agrobacterium tumefaciens* kmen GV3101, které byly kultivovány na YEB médiu s přidavkem antibiotik podle selekčního markeru přítomného ve vloženém vektoru. Bakteriální kultury byly inkubovány 3 dny při teplotě 28 °C v termostatu nebo 1 den při 28 °C v inkubované rotační třepače při 220 rpm.

#### 4.1.3 Vektory

Všechny vektory použité při Gateway technologii a jejich základní charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 1.

**Tabulka 1:** Seznam použitých vektorů.

Název	Bakteriální rezistence	Velikost [bp]
pDONR P1-P4	carbenicillin	3157
pDONR P4r-P2	carbenicillin	3219
pENTR TurboID HA P4r-P2	kanamycin	11074
pK2GW7.0	spectinomycin	11168

## 4.2 Použité chem ikálie, soupravy a roztoky

### 4.2.1 Použité chemikálie

- 6x TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R1161)
- Agarose I<sup>TM</sup> (VWR Chemicals, kat. č. 0710-500G)
- Destilovaná voda
- DMSO (dimethylsulfoxid) (Sigma-Aldrich, kat. č. 27043-1)
- DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EP0701)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751-5G)
- Gateway<sup>TM</sup> BP Clonase<sup>TM</sup> II Enzyme mix (Invitrogen<sup>TM</sup>, kat. č. 11791100)
- Gateway<sup>TM</sup> LR Clonase<sup>TM</sup> II Enzyme mix (Invitrogen<sup>TM</sup>, kat. č. 11789100)
- GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM1331)
- Proteinase K Solution (Invitrogen<sup>TM</sup>, kat. č. 25530049)
- Q5<sup>®</sup> High Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, kat. č. M0491)
- Substral Careo (SCOTT'S, kat. č. 1241021)

### 4.2.2 Použité soupravy

- GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K0692)
- GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K0792)
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K0503)

### 4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

½ Murashige a Skoog (MS) médium (pH 5,8) s 0,6% agarem: Smíchat 2,2 g MS soli, 10 g sacharózy, 1 g MES a 16 g agaru. Doplnit do objemu 1 l destilovanou vodou, upravit pH na 5,8 pomocí 3M KOH a připravený roztok autoklávovat.

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

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

LB médium: Smíchat 10 g peptonu, 5 g kvasničného extraktu a 15 g NaCl. Pro výrobu tuhého média přidat navíc 15 g agaru. Doplnit do objemu 1 l destilovanou vodou, upravit pH na 7,0 pomocí 3M KOH a připravený roztok autoklávovat.

TE pufr: Smíchat 1,21 g Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) a 0,37 g EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina). Dolít do 100 ml destilovanou vodou. Připravený roztok o pH 8,0 sterilizovat autoklávováním.

**YEB médium:** Smíchat 0,5 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 5 g hlohovězího extraktu, 5 g peptonu, 5 g sacharózy a 1 g kvasničného extraktu. Pro výrobu tuhého média přidat navíc 15 g agaru. Doplnit do objemu 1 l destilovanou vodou, upravit pH na 7,2 pomocí 3M KOH a připravený roztok autoklávovat.

#### 4.2.4 Použité primery

Primery použité při PCR amplifikaci a Sangerově sekvenování byly navrženy manuálně Mgr. Evou Dvořák Tomašíkovou, Ph.D. Seznam použitých primerů a jejich základní charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 2.

**Tabulka 2:** Seznam primerů určených pro PCR amplifikaci a Sangerovo sekvenování.

Název	Sekvence 5' → 3'	Velikost PCR produktu [bp]
ET0474	GGGGACAACCTTTTCTATACAAAAGTTGCGATGGAAAATGTGGTTG	2206
ET0475	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGTAGTTGCGACGGTG	
ET0476	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGAGTTCGGCGAATT	1900
ET0477	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTGAGTGCCGACATTAGGAGC	
ET0478	GGGGACAACCTTTTCTATACAAAAGTTGCGATGAGTTCGGCGAATT	1888
ET0479	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAGTGCCGACATTAGG	
ET0003	GTAAAACGACGGCCAGT	2189
ET0004	CAGGAAACAGCTATGAC	
ET0238	ATGGAAAATGTGGTTGCAACT	2329
ET0004	CAGGAAACAGCTATGAC	
ET0013	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	2900
ET0014	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	

## **4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení**

### **4.3.1 Přístroje a zařízení**

- Analytické váhy (Sartorius)
- Cell density meter Ultrospec 10 (Amersham Biosciences)
- Centrifuga
- Digitální předvážky Scout SC4010 (Ohaus)
- Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
- Hlubokomrazicí box
- Homogenizátor Silamat S6 (Ivoclar Vivadent)
- Horizontální elektroforéza MultiSUB Choice Trio (Clever Scientific)
- Inkubovaná třepačka Forma 420 (Thermo Fisher Scientific)
- Laminární box Jouan MSC 9 (Thermo Fisher Scientific)
- Lednice RK (Gorenje)
- Magnetická míchačka AREX Digital (P-Lab a.s.)
- Mikrocentrifuga Microstar 17R (VWR)
- Mikrovlnná trouba (Daewoo)
- NanoDrop One spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific)
- Růstová komora (Percival Scientific)
- Termocykler T-Gradient (Biometra)
- Termocykler C1000 Touch Thermal Cyclor (BIO-RAD)
- Termomixer thermal (VWR)
- Termostat BT 120 M (1-CUBE)
- Termostatovaná třepačka MaxQ (Thermo Fisher Scientific)
- Transiluminátor InGenius 3 (Syngene)
- Třepačka vortex VV3 (VWR)
- Třepačka Multi-Vortex V-32 (Biosan)
- Vodní lázeň TW8 (Julabo)
- Výrobník ledu (Brema)
- Zdroj napětí POWER Pro (Clever Scientific)

### **4.3.2 Programy**

- SnapGene
- Microsoft Excel (Microsoft)

## 4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací metody

### 4.4.1 Izolace gDNA

Pro izolaci gDNA byly využity rostliny huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) linie *Col-0*. Do 1,5 ml mikrozkušavky byly vloženy dva lístky rostliny. K listům byly přidány kuličky sloužící k homogenizaci a mikrozkušavka byla vhozena do nádoby s tekutým dusíkem. Následně byla zkumavka dána do homogenizátoru Silamat S6 na dobu 10 s. Zkumavka byla opět vhozena do nádoby s tekutým dusíkem a poté homogenizována po dobu 10 s. Dále bylo postupováno podle protokolu soupravy GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit.

### 4.4.2 Měření koncentrace a vyhodnocení čistoty izolované nukleové kyseliny

Po izolaci gDNA bylo třeba stanovit její koncentraci a vyhodnotit kvalitu. K měření byl použit spektrofotometr NanoDrop One. Pomocí automatické pipety byl do spektrofotometru nanášen 1  $\mu$ l vzorku izolované gDNA. Čistota byla určována z poměru hodnot absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm. Čistá gDNA vykazovala hodnotu A260/A280 okolo 1,8.

### 4.4.3 Polymerázová řetězcová reakce

Pro PCR amplifikaci konkrétních nukleotidových sekvencí DNA byla použita Q5® High Fidelity DNA Polymerase. Nejprve byly připraveny PCR reakční směsi. Seznam použitých primerů je uveden v Tabulce 2. Složení PCR reakční směsi a množství jednotlivých látek je uvedeno v Tabulce 3. K vytvořené reakční směsi byla následně přidána templátová DNA. Výsledný objem reakce byl 50  $\mu$ l. Takto připravené vzorky byly vloženy do termocykleru. Časový a teplotní profil PCR reakce je znázorněn v Tabulce 4.

**Tabulka 3:** Složení PCR reakční směsi pro amplifikaci inzertů.

Složka	Koncentrace zásobního roztoku	Finální koncentrace	Množství [ $\mu$ l]
Q5 Reaction Buffer	5x	1x	10
dNTPs	10 mM	200 $\mu$ M	1
Forward Primer	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	2,5
Reverse Primer	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	2,5
Q5 High Fidelity DNA Polymerase	25 U/ $\mu$ l	0,02 U/ $\mu$ l	0,5
Templátová DNA	42,5 ng/ $\mu$ l	100 ng	2,5
Destilovaná voda			31

**Tabulka 4:** Časový a teplotní profil PCR amplifikace inzertů.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Denaturace	98	30 s	1
Annealing	98	10 s	35
	60	30 s	
	72	30 s/kb	
Elongace	72	2 min	1

Pro ověření inzertu v bakteriálních kulturách byla využita metoda colony PCR. Pro tento typ PCR amplifikace byla použita DreamTaq DNA Polymerase. Nejprve byly připraveny PCR reakční směsi. Seznam použitých primerů je uveden v Tabulce 2. Složení PCR reakční směsi a množství jednotlivých látek je uvedeno v Tabulce 5. K vytvořené reakční směsi byla následně jako templátová DNA přidána jedna bakteriální kolonie. Výsledný objem reakce byl 20  $\mu$ l. Takto připravené vzorky byly vloženy do termocykleru. Časový a teplotní profil PCR reakce je znázorněn v Tabulce 6.

**Tabulka 5:** Složení reakční směsi pro colony PCR.

Složka	Koncentrace zásobního roztoku	Finální koncentrace	Množství [ $\mu$ l]
Q5 Reaction Buffer	10x	1x	2
dNTPs	2 mM	200 $\mu$ M	2
Forward Primer	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1
Reverse Primer	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1
DreamTaq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ l	0,5 U/ $\mu$ l	0,1
Destilovaná voda			13,9
Templátová DNA			1 kolonie

**Tabulka 6:** Časový a teplotní profil colony PCR.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95	3 min	1
Annealing	95	30 s	35
		30 s	
	72	1 min/kb	
Elongace	72	10 min	1

#### 4.4.4 Agarózová gelová elektroforéza

Pro separaci PCR produktů byla využita metoda agarózové gelové elektroforézy. Vzorky byly separovány v 1% agarózovém gelu s přídavkem ethidium bromidu. Do první jamky bylo napipetováno 6 µl GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder pro porovnání velikosti PCR produktů. Při colony PCR byl navíc k vzorkům přidáván 6x TriTrack DNA Loading Dye pro vizuální sledování migrace DNA během elektroforézy. Elektroforetická separace probíhala po dobu 30 minut při napětí 100 V. Po jejím skončení byl gel přenesen do UV transiluminátoru, pomocí kterého byl pozorován výsledek.

#### 4.4.5 Izolace a purifikace PCR produktu z gelu

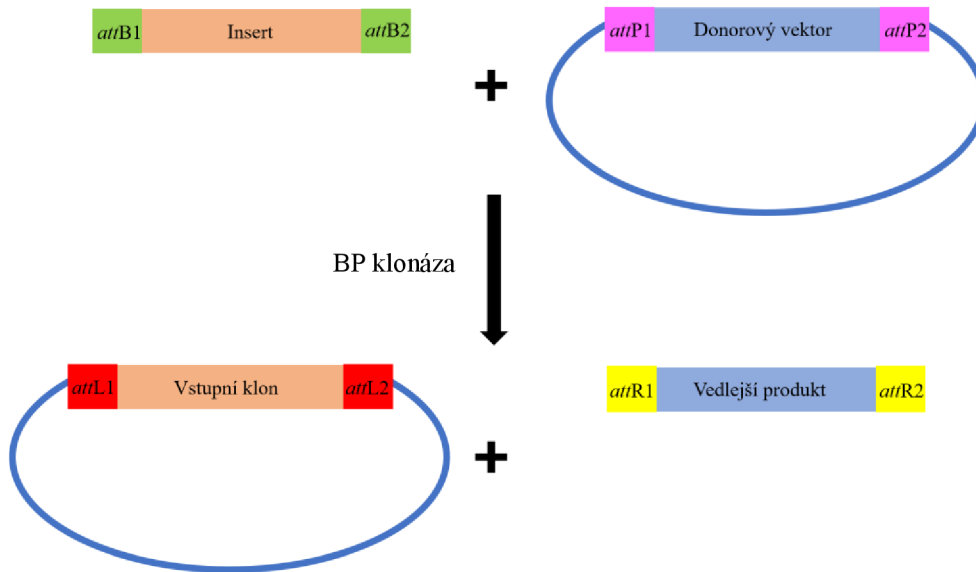
Amplifikované a separované PCR produkty odpovídající velikosti byly vyřezány z gelu pomocí skalpelu. Následně byly vzorky vyřezaného gelu vloženy do mikrozkuhavky a zváženy. Dále byly produkty vyzolovány z gelu podle protokolu soupravy GeneJET Gel Extraction Kit. U izolovaných produktů bylo poté třeba stanovit jejich koncentraci a vyhodnotit kvalitu. K měření byl použit spektrofotometr NanoDrop One.

#### 4.4.6 MultiSite Gateway klonování

MultiSite Gateway klonování je klonovací technologie vlastněná společností Invitrogen, která umožňuje rychlý a vysoce účinný přenos hned několika sekvencí DNA do plasmidů za využití specifických rekombinačních sekvencí *att* (attachment sites) a enzymových směsí: BP klonázy a LR klonázy. Při tomto klonování se zachovává orientace čtecího rámce a není zapotřebí restričních enzymů. MultiSite Gateway klonování se skládá ze dvou reakcí nesoucích název podle využívané enzymové směsi: BP reakce a LR reakce.

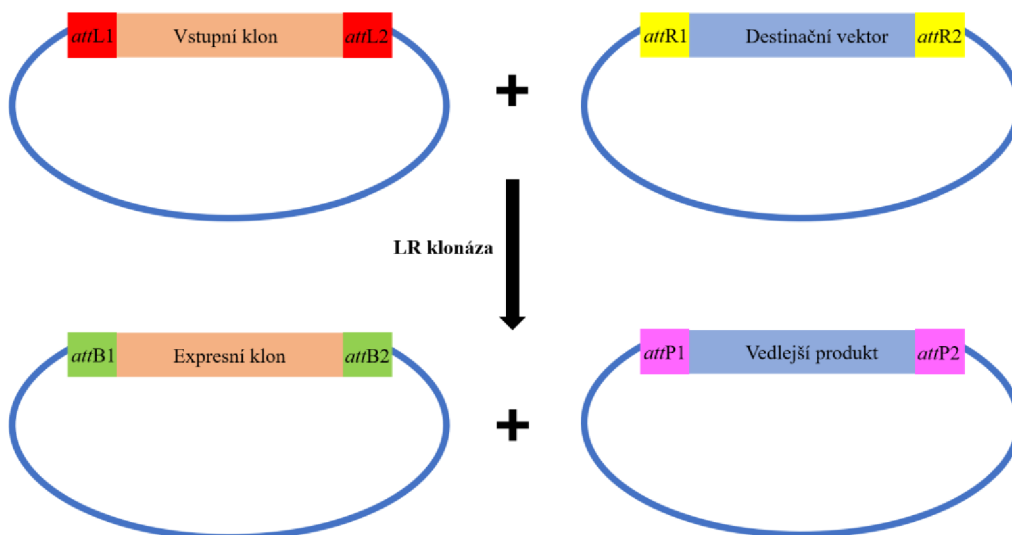
První reakcí MultiSite Gateway klonování je BP reakce, kdy pomocí BP klonázy dochází k rekombinaci specifických *attB* míst na zvoleném DNA fragmentu se specifickými *attP* místy donorového vektoru. Dochází tak ke vzniku vstupního klonu se specifickými *attL* místy obklopujícími vložený DNA fragment a vedlejšího produktu lemovaného specifickými *attR* místy. Schéma BP reakce je znázorněno na Obrázku 6.





**Obrázek 6:** Schéma BP reakce.

Druhou reakcí MultiSite Gateway klonování je LR reakce, kdy pomocí LR klonázy dochází k rekombinaci specifických *attL* míst vstupního klonu se specifickými *attR* místy destinačního vektoru. Dochází tak ke vzniku expresního klonu se specifickými *attB* místy obklopujícími vložený DNA fragment a vedlejšího produktu se specifickými *attP* místy. Schéma LR reakce je znázorněno na Obrázku 7.



**Obrázek 7:** Schéma LR reakce.

#### 4.4.6.1 BP reakce

Pro BP reakci byly použity produkty PCR – C a N fúze genů *STUBL2* a *WSS1A* ohraničené *attB* místy vnesenými pomocí specifických primerů. Jako donorový vektor se specifickými *attP* místy byl použit vektor pDONR P1-P4 nebo pDONR P4r-P2 s rezistencí na carbenicillin. Přesné složení reakční směsi je znázorněno v Tabulce 7. Takto připravená reakční směs byla inkubována přes noc při pokojové teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 1  $\mu$ l Proteinázy K reakční směsi a následnou inkubací 10 min při teplotě 37 °C.

**Tabulka 7:** Složení reakční směsi pro BP reakci.

Složka	Množství
PCR produkt	100 ng
donorový vektor	150 ng
BP klonáza	2 $\mu$ l
TE pufr	do 10 $\mu$ l

#### 4.4.6.2 LR reakce

Pro LR reakci byl jako vstupní klon použity pENTR L1-L4 *WSS1A* se specifickými *attL* místy *attL1* a *attL4r*. Jelikož se jedná o MultiSite klonování, byly vkládány rovnou dva vstupní klony. Druhým vstupním klonem byl pENTR L4r-L3 TurboID ohraničený specifickými *attL* místy *attL4r* a *attL2*. Jako destinační vektor byl použit vektor pK2GW7.0 s rezistencí na spektinomycin. Přesné složení reakční směsi je znázorněno v Tabulce 8. Takto připravená reakční směs byla inkubována přes noc při pokojové teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 1  $\mu$ l Proteinázy K reakční směsi a následnou inkubací 10 min při teplotě 37 °C.

**Tabulka 8:** Složení reakční směsi pro LR reakci.

Složka	Množství
vstupní klon 1	50 ng
vstupní klon 2	50 ng
destinační vektor	150 ng
LR klonáza	2 $\mu$ l
TE pufr	do 10 $\mu$ l

#### **4.4.7 Transformace bakterií *E. coli***

Po BP i LR reakci byly konstrukty vzniklé klonováním transformovány do bakterií *E. coli* pomocí metody teplotního šoku. Transformované bakterie byly vysety na misky s tuhým LB médiem a příslušným antibiotikem. Vyrostlé kolonie byly ověřovány na přítomnost insertu pomocí metody colony PCR (viz kapitola 4.4.3.).

Pro transformaci následující po BP reakci bylo využito kompetentních bakterií *E. coli* STBL2. Ke zmraženým kompetentním bakteriím byla napipetována celá směs BP reakce. Bakterie se směsí byly ponechány 30 min na ledu. Následoval teplotní šok, kdy byla zkumavka s bakteriemi inkubována při 42 °C po dobu 45 s. Poté byly bakterie inkubovány na ledu po dobu 2 min. K buňkám bylo následně přidáno 500 µl tekutého LB média a zkumavka byla inkubována v termostátované třepačce při teplotě 37 °C a 500 rpm po dobu 45 min. Po 45 minutách byla celá suspenze centrifugována při 17 000 g po dobu 2 min. Supernatant byl slit a pelet byl resuspendován ve 150 µl tekutého LB média. Takto připravená suspenze byla rozetřena na Petriho misky s tuhým LB médiem a selekčním antibiotikem carbenicilinem (100 µg/ml). Misky byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

Pro transformaci následující po LR reakci bylo využito kompetentních bakterií *E. coli* TOP10. Průběh transformace byl téměř totožný jako při předchozí transformaci jen s jedním rozdílem. Teplotní šok při 42 °C byl pouze po dobu 30 s. Vytvořená suspenze byla rozetřena na Petriho misky s LB médiem, ale tentokrát bylo jako antibiotikum přidán spectinomycin (25 µg/ml). Misky byly taktéž inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

Kolonie, ve kterých byla ověřena přítomnost insertu pomocí colony PCR (viz kapitola 4.4.3.) byly pomocí sterilní špičky přeneseny do zkumavek s 5 ml tekutého LB média a příslušným antibiotikem (stejným, které bylo obsaženo v tuhém LB médiu). Zkumavky byly inkubovány přes noc v termostátované třepačce při 220 rpm a teplotě 37 °C.

#### **4.4.8 Izolace plasmidů**

Pro izolaci plasmidové DNA z bakteriální suspenze v tekutém LB médiu byl použit GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Postup izolace byl proveden podle protokolu soupravy. U izolovaných produktů bylo poté třeba stanovit jejich koncentraci a vyhodnotit kvalitu. K měření byl použit spektrofotometr NanoDrop One.

#### **4.4.9 Kontrola pomocí Sangerova sekvenování**

Pro ověření sekvence izolované plasmidové DNA byly podle požadavků firmy SEQME připraveny vzorky, které byly následně zaslány na sekvenování. Požadavky pro sekvenování plasmidu s vlastními primery jsou uvedeny v Tabulce 9.

**Tabulka 9:** Požadavky pro sekvenování plasmidu s vlastními primery.

Složka	Množství	Použité primery	Celkový objem
Plasmid	500 ng	25 pmol (tj. 2,5 $\mu$ l 10 $\mu$ mol·l <sup>-1</sup> roztoku primerů)	10 $\mu$ l

Součástí směsi tedy bylo 2,5  $\mu$ l 10  $\mu$ mol·l<sup>-1</sup> roztoku primerů, doporučené množství plasmidové DNA, směs byla doplněna do 10  $\mu$ l destilovanou vodou.

#### 4.4.10 Transformace bakterií *A. tumefaciens*

Po ověření sekvence plasmidů byl plasmid se správnou sekvencí transformován do bakterií *A. tumefaciens* pomocí metody freeze-thaw. Pro transformaci byly použity kompetentní bakterie *A. tumefaciens* GV3101.

Ke zmrzlým bakteriím byl přidán 1  $\mu$ g plasmidové DNA. Zkumavka s bakteriemi byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 5 min. K bakteriím byl přidán 1 ml tekutého YEB média a celá suspenze byla inkubována v termostatované třepačce po dobu 4 h při teplotě 28 °C a 500 rpm. Suspenze byla následně zcentrifugována při 13 000 rpm po dobu 30 s. Supernatant byl slit a pelet resuspendován ve 100  $\mu$ l tekutého YEB média. Takto připravená suspenze byla rozetřena na Petriho misky s tuhým YEB médiem a antibiotiky: spectinomycin (100  $\mu$ g/ml), rifampicin (25  $\mu$ g/ml) a gentamycin (50  $\mu$ g/ml). Misky byly inkubovány 3 dny při teplotě 28 °C.

Kolonie, ve kterých byla ověřena přítomnost vektoru pomocí colony PCR (viz kapitola 4.4.3.) byly pomocí sterilní špičky přeneseny do zkumavek s 5 ml tekutého YEB média a příslušnými antibiotiky (stejnými, které byly obsaženy v tuhém YEB médiu). Zkumavky byly inkubovány přes noc v termostatované třepačce při 220 rpm a teplotě 28 °C.

Následně byly připraveny misky pro růst bakterií. Byly připraveny Petriho misky s tuhým médiem a antibiotiky: spectinomycin (100  $\mu$ g/ml), rifampicin (25  $\mu$ g/ml) a gentamicin (50  $\mu$ g/ml), na které bylo křížovým roztěrem rozetřeno 100  $\mu$ l bakterií v tekutém YEB médiu. Misky byly inkubovány přes noc při teplotě 28 °C. Pro příslušné bakteriální klony byly vytvořeny také bakteriální konzervy.

#### 4.4.11 Transformace rostlin *A. thaliana*

Bakterie z misek byly pomocí sterilní špičky přeneseny do zkumavek s 5 ml tekutého YEB média a příslušnými antibiotiky (stejnými, které byly obsaženy v tuhém YEB médiu). Zkumavky byly inkubovány přes noc v termostatované třepačce při 225 rpm a teplotě 28 °C. Následující den byl 1 ml bakteriální suspenze přenesen do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml čerstvého tekutého YEB média s antibiotiky. Baňky byly inkubovány přes noc v termostatované třepačce při 225 rpm a teplotě 28 °C. Další den byla bakteriální suspenze zcentrifugována při 4500 rpm a teplotě 4 °C po dobu 20 min.

Supernatant byl slit a pelet resuspendován v 5% sacharóze tak, aby optická hustota při vlnové délce 600 nm dosáhla hodnoty 0,8. Následně bylo do roztoku přidán acetosyringon do výsledné koncentrace 200  $\mu$ M (do 200 ml bakteriální suspenze 400  $\mu$ l 100mM acetosyringonu) a Silwet L-77 do výsledné koncentrace 0,05% (do 200 ml bakteriální suspenze 100  $\mu$ l Silwet L-77). Celá suspenze byla pořádně promíchána a do takto připravené suspenze byla ponořena květenství vybraných rostlin *A. thaliana* po dobu 3 s. Rostliny byly přikryty tmavým igelitem a pěstovány ve fytotronové komoře a následně ve skleníku (bez igelitu).

#### **4.4.12 Ověření přítomnosti konstruktů v T<sub>1</sub> generaci rostlin**

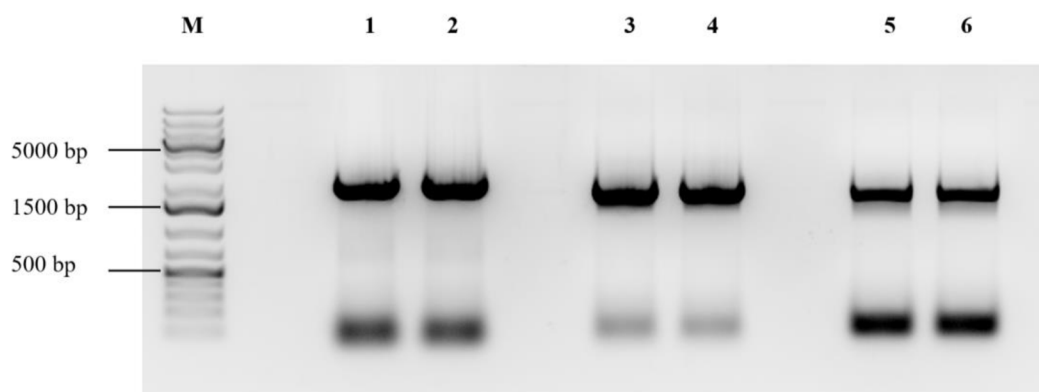
Transformované rostliny byly pěstovány zhruba 2 měsíce. Poté byly z rostlin do mikrozkušavek sesbírány jejich semena, která byla nejprve třeba vysterilizovat. Do zkumavek se semeny bylo přidáno 500  $\mu$ l 70% ethanolu. Zkumavky byly dány do na 10 min do třepačky. Poté byl ethanol odpipetován a k semenům bylo přidáno 500  $\mu$ l 97% ethanolu. Ethanol byl opět odpipetován a zkumavky byly ponechány s otevřenými víčky, aby semena mohla vyschnout.

Přítomnost konstruktů byla ověřena vyšetím sterilních semen na médiu se selekčními antibiotiky. K vysušeným semenům byl přidán 1 ml 0,1% agarózy a semena byla pipetou rovnoměrně rozprostřena na Petriho misky s ½ MS médium s 0,6% agarem a kanamycinem (50  $\mu$ g/ml). Misky byly uchovány v růstové komoře po dobu 2 týdnů. Rostliny rezistentní k selekčním antibiotikům, a tedy obsahující konstrukt byly přesazeny do substrátu ošetřeného přípravkem Careo. Takto připravené rostliny byly pěstovány ve fytotronové komoře do sklizně. Rostliny budou použity pro další analýzy.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Amplifikace genů *WSSIA* a *STUbl2* a izolace fragmentů z agarózového gelu

Templátem pro amplifikaci genů *WSSIA* a *STUbl2* byla genomická DNA izolovaná z *A. thaliana* linie *Col-0* (viz kapitola 4.4.1). Koncentrace gDNA byla 42,5 ng/μl. Dále byly použity specificky navržené primery ET472-477 (viz Tabulka 2). Výsledkem PCR byly amplifikované geny pro *WSSIA* (C fúze i N fúze) a *STUbl* (pouze N fúze) ohraničené specifickými *attB* místy potřebné pro BP reakci (Gateway technologie). PCR produkty byly separovány v 1% agarózovém gelu v TAE pufru při napětí 100 V (Obrázek 8) po dobu 30 minut.



**Obrázek 8:** Elektroforetické vyhodnocení PCR amplifikace produktů *WSSIA* a *STUbl2*.

Všechny PCR produkty dosáhly předpokládané velikosti. *STUbl2*: 2206 bp a *WSSIA*: 1900 bp. Zleva: M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1-2: *STUbl2* (N fúze), 3-4: *WSSIA* (C fúze), 5-6: *WSSIA* (C fúze).

Amplifikované fragmenty byly následně izolovány z agarózového gelu pomocí GeneJET Gel Extraction Kit a pomocí spektrofotometru NanoDrop One byly zjištěny hodnoty jejich koncentrací (Tabulka 10).

**Tabulka 10:** Získané koncentrace amplifikovaných a extrahovaných fragmentů.

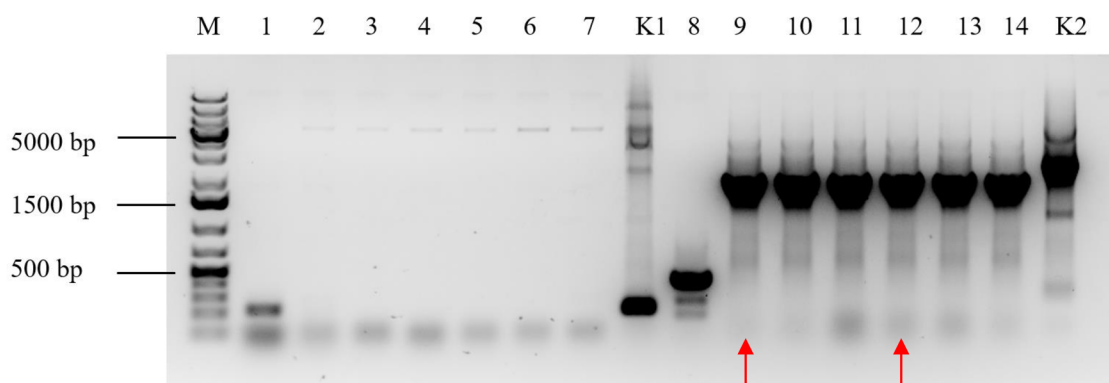
Fragment	Koncentrace [ng/μl]
<i>STUbl2</i> (N fúze)	29,6
<i>WSSIA</i> (C fúze)	34,2
<i>WSSIA</i> (N fúze)	15,2

## 5.2 Příprava vstupních klonů pomocí BP reakce

Pomocí BP reakce (Gateway metoda) byly připravovány vstupní klony. Pro jejich vytvoření byly použity amplifikované a izolované fragmenty s geny pro *STUbl2* a *WSSIA* s *attB* přesahovými místy společně s donorovými vektory pDONR P4r-P2 a pDONR P1-P4. Byly tak vytvořeny vstupní klony pDONR P4r-P2:*STUbl2* (N koncová fúze) a pDONR P1-P4:*WSSIA* (N koncová a C koncová fúze) o velikosti kolem 2200 bp. Tyto vstupní klony byly následně transformovány do bakterií *E. coli* STBL2 pomocí teplotního šoku. Transformované bakterie byly následně kultivovány na plotnách s médiem a selekčním antibiotikem carbenicilinem.

### 5.2.1 Ověření správnosti konstruktů pomocí colony PCR a Sangerova sekvenování

Narostlé bakteriální kolonie s přítomností rezistenčního markeru pro carbenicilin byly pomocí colony PCR ověřeny na přítomnost vloženého konstruktu. I přes řadu optimalizací se nepodařilo žádné kolonie nesoucí pDONR P1-P4:*WSSIA* (N fúze). Z každé ze zbývajících misek bylo vždy odebráno sedm kandidátních kolonií, u kterých se provádělo toto testování. PCR produkty byly separovány v 1% agarózovém gelu v TAE pufru při napětí 100 V po dobu 30 minut (Obrázek 9). I přes testování značného množství kolonií se podařilo získat pouze vstupní klon pDONR P1-P4:*WSSIA* (C fúze). Následující kroky byly tedy prováděny pouze s tímto konstruktem.



**Obrázek 9:** Elektroforetické vyhodnocení colony PCR testovaných na přítomnost konstruktů pDONR P4r-P2:*STUbl2* a pDONR P1-P4:*WSSIA* v *E. coli*.

Zleva: M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1-8: pDONR P4r-P2:*STUbl2*, K1: kontrola pomocí prázdného vektoru, 8-14: pDONR P1-P4:*WSSIA* (velikost 2189 bp), K2: kontrola pomocí prázdného vektoru. Červené šipky označují kolonie, se kterými bylo následně pracováno dál.

Vybrané kolonie byly následně přeočkovány do tekutého média se selekčním antibiotikem carbenicilinem, ze kterého byly samotné plasmidové konstrukty izolovány pomocí GeneJET Plasmid Miniprep Kit a následně a pomocí spektrofotometru NanoDrop One byly zjištěny hodnoty jejich koncentrací (Tabulka 11).

**Tabulka 11:** Získané koncentrace plasmidových konstruktů pDONR P1-P4:WSSIA (C fúze).

Název	Koncentrace [ng/μl]
pDONR P1-P4:WSSIA (kolonie 9)	245,3
pDONR P1-P4:WSSIA (kolonie 12)	238,6

Plasmidové konstrukty byly následně odeslány na kontrolu pomocí Sangerova sekvenování (viz kapitola 4.4.9), kde bylo potvrzena jejich správnost u všech testovaných kolonií.

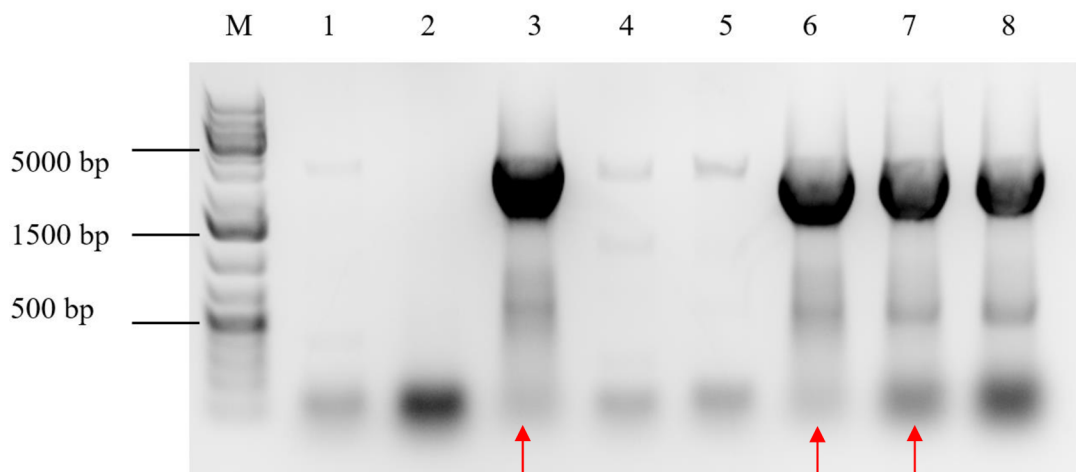
### 5.3 Příprava expresních klonů pomocí LR reakce

Pomocí LR reakce (Gateway metoda) byly připravovány expresní klony. Pro jejich vytvoření byl použit vytvořený vstupní klon pDONR P1-P4:WSSIA společně s pENTR TurboID HA P4r-P2 a destinačním vektorem pK2GW7.0. Byl tak vytvořen expresní klon pK2GW7.0:WSSIA:TurboID HA o velikosti kolem 2900 bp, který byl následně transformován do bakterií *E. coli* TOP10 pomocí teplotního šoku. Transformované bakterie byly poté kultivovány na plotnách s médiem a selekčním antibiotikem spectinomycinem.

#### 5.3.1 Ověření správnosti konstruktů pomocí colony PCR a Sangerova sekvenování

Narostlé bakteriální kolonie s přítomností rezistenčního markeru pro spectinomycin byly pomocí colony PCR ověřeny na přítomnost vloženého konstruktu. Z misky bylo odebráno osm kandidátních kolonií, u kterých se provádělo toto testování. PCR produkty byly separovány v 1% agarózovém gelu v TAE pufru při napětí 100 V po dobu 30 minut (Obrázek 10).





**Obrázek 10:** Elektroforetické vyhodnocení colony PCR testovaných na přítomnost konstruktů pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA v *E. coli*.

Zleva: M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1-8: pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA. Červené šipky označují kolonie, se kterými bylo následně pracováno dál.

Vybrané kolonie byly následně přeočkovány do tekutého média se spectinomycinem, ze kterého byly samotné plasmidové konstrukty izolovány pomocí GeneJET Plasmid Miniprep Kit a následně a pomocí spektrofotometru NanoDrop One byly zjištěny hodnoty jejich koncentrací (Tabulka 12).

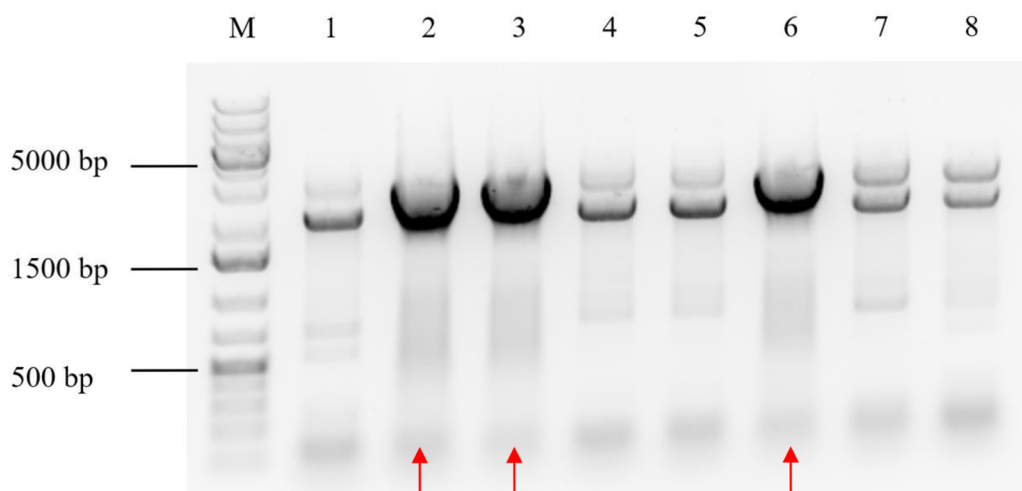
**Tabulka 12:** Získané koncentrace plasmidových konstruktů pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA.

Název	Koncentrace [ng/μl]
pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA (kolonie 3)	21,2
pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA (kolonie 6)	57,6
pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA (kolonie 7)	36,1

Plasmidové konstrukty byly následně odeslány na kontrolu pomocí Sangerova sekvenování (viz kapitola 4.4.9), kde bylo potvrzena správnost pouze u kolonií 3 a 7.

#### 5.4 Transformace a ověření bakterií *A. tumefaciens*

Vytvořené konstrukty byly transformovány do bakterií *A. tumefaciens* GV3101 pomocí metody freeze-thaw. Transformované bakterie byly poté kultivovány na plotnách s médiem. Jako selekční antibiotika byla použita spectinomycin, rifampicin a gentamycin. Narostlé bakteriální kolonie byly pomocí colony PCR ověřeny na přítomnost vloženého konstruktů pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA o velikosti kolem 2900 bp. Z misky bylo odebráno osm kandidátních kolonií, u kterých se provádělo toto testování. PCR produkty byly separovány v 1% agarózovém gelu v TAE pufru při napětí 100 V po dobu 30 minut (Obrázek 11).

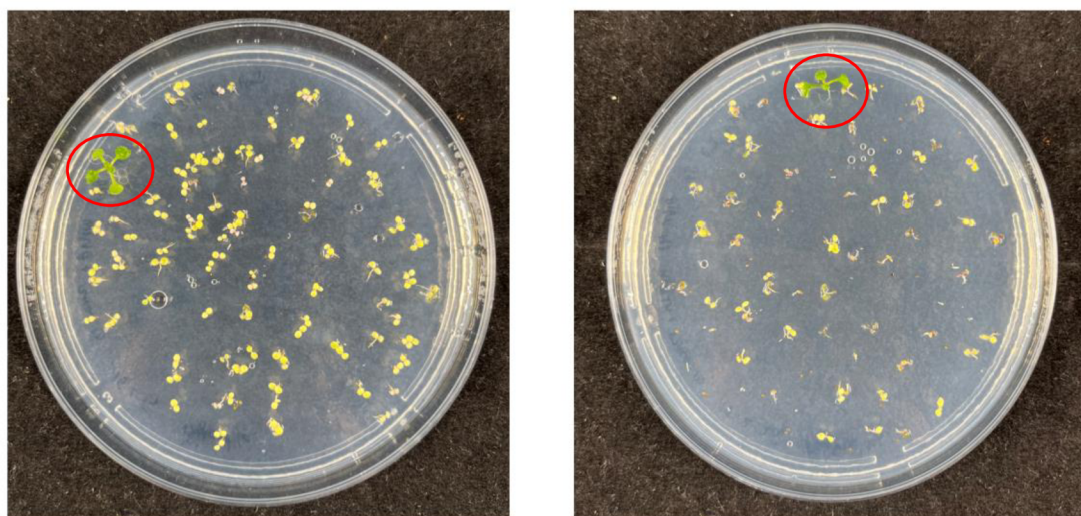


**Obrázek 11:** Elektroforetické vyhodnocení colony PCR testovaných na přítomnost konstruktů pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA v *A. tumefaciens*.

Zleva: M: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, 1-8: pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA. Červené šipky označují kolonie, se kterými bylo následně pracováno dál.

## 5.5 Transformace *A. thaliana* a selekce transformantů na médiu se selekčními antibiotiky

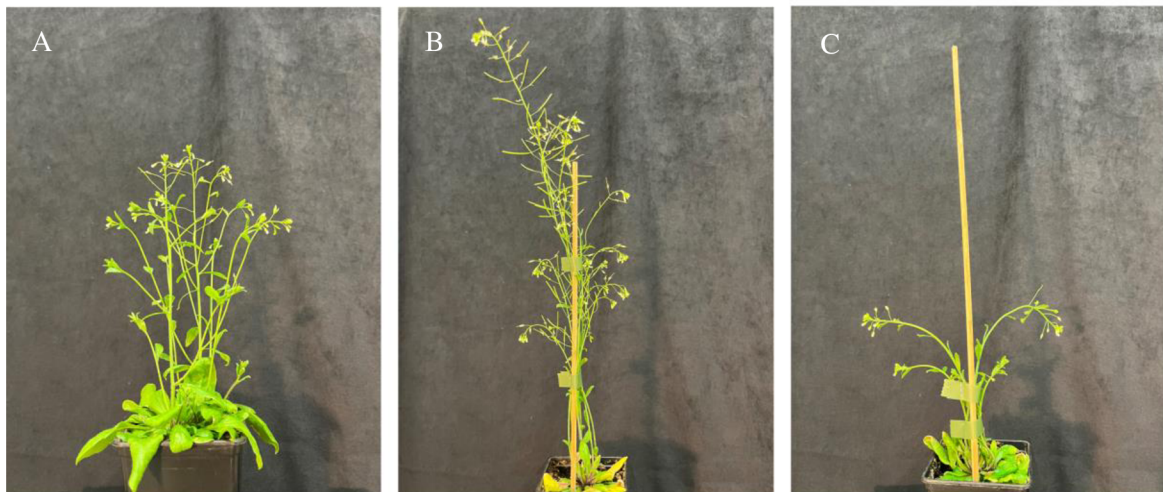
Pomocí bakterií *A. tumefaciens* byl metodou floral dip transformován konstrukt pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA do rostlin *A. thaliana* linie *Col-0* (WT) a *wss1a* (mutantní linie neobsahující gen pro metaloproteázu WSS1A). Sesbíraná semena transformovaných rostlin, označená jako T1 generace, byla následně vyseta na médium s kanamycinem (50 µg/ml). Po dvou týdnech rostliny obsahující konstrukt se selekčním markerem vyrostly na médiu s antibiotiky. Od ostatních se odlišují svojí velikostí, a především silnějším kořínkem (Obrázek 12).



**Obrázek 12:** Selekcce transformantů na médiu se selekčními antibiotiky.

Vlevo: Vysazená semena transformované *A. thaliana* linie *Col-0*. Vpravo: vysazená semena transformované *A. thaliana* linie *wss1a*. Rostliny obsahující konstrukt se selekčním markerem jsou zakroužkovány červeně. Všechna semena byla vyseta na Petriho misky s ½ MS médiem s 0,6% agarem a kanamycinem.

Rostliny obsahující selekční marker, které vyrostly na médiu s antibiotiky, byly poté přesazeny do substrátu a přesunuty do fytotronové komory (Obrázek 13). Transformované rostliny nevykazovaly žádný specifický fenotyp. Tyto rostliny budou použity v dalších experimentech. Nejprve bude ověřena přítomnost a funkčnost konstruktů metodou western blotting, kde se bude dokazovat přítomnost HA-tag a biotinylované formy. Pokud se přítomnost a funkčnost konstruktu ověří, budou transformované rostliny využity především pro studium proteinových interakcí s metaloproteázou WSS1A pomocí TurboID proximity labeling značení.



**Obrázek 13:** Transformované rostliny *A. thaliana*.

A: Netransformovaná rostlina *A. thaliana* linie *Ccol-0* (WT). B: Transformovaná rostlina *A. thaliana* linie *Col-0* s konstruktem pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA. C: Transformovaná rostlina *A. thaliana* linie *wss1a* s konstruktem pK2GW7.0:WSS1A:TurboID HA.

## 6 DISKUSE

Na DNA působí každou vteřinu endogenní a exogenní činitele způsobující různé druhy poškození, čímž dochází k narušení její integrity, která je pro život buněk a celého organismu velmi důležitá. Jedním z druhů poškození DNA jsou DNA-proteinové crosslinky (DPC), kdy dochází k vytvoření kovalentní vazby mezi DNA a proteinem. Vzniká tak velmi objemný adukt, který zabraňuje přístupu jiných enzymů k DNA a narušuje průběh esenciálních buněčných procesů důležitých pro život buňky, jako je například dělení buněk, transkripce nebo replikace (Hacker *et al.*, 2020). Mezi činitelů způsobujících DPC patří např. reaktivní aldehydy, ROS, různé druhy záření (UV, IR) nebo chemické látky, např. mitomycin C (MMC), kamptotecin (CPT), etoposid (Eto) či zebularin (ZEB) (Enderle, Dorn, *et Puchta*, 2019; Hacker *et al.*, 2020; Kojima *et Machida*, 2020, Prochazkova *et al.*, 2022).

Aby k tomuto nedošlo, vytvořily si organismy několik na sobě nezávislých mechanismů pro opravy DPC. Jedná se o endonukleotické štěpení, proteolytickou degradaci a enzymatickou hydrolyzu, kdy každý z mechanismů cílí na jinou část DPC. Endonukleotickém štěpení cílí na DNA část DPC. Při proteolytické degradaci dochází k odstranění proteinové části DPC a enzymatická hydrolyza odstraňuje vazbu mezi DNA a proteinem (Enderle, Dorn, Beying, *et al.*, 2019; Hacker *et al.*, 2020). Každého mechanismu se účastní specifické proteiny a jedním z těchto proteinů je i metaloproteáza Weak suppressor of SMT protein 1 (WSS1A) účastnící se proteolytické degradace DPC u rostlin. Tento rostlinný mechanismus však na rozdíl od živočichů nebo kvasinek nebyl dosud pořádně prozkoumán (Stingele *et al.*, 2016). Je pouze známo, že mutanti *Atwss1A* vykazují specifický fenotyp s krátkými kořeny, sníženou plodností, ale naopak se zvýšenou citlivostí vůči některým látkám způsobujícím DPC. Tím je dokázáno, že WSS1A hraje určitou roli při opravách DPC a pokud rostlina neobsahuje gen pro WSS1A, nedochází k opravám DPC, což zapříčiňuje zmíněné fenotypové odchylky (Enderle, Dorn, Beying, *et al.*, 2019; Hacker *et al.*, 2020). Stejně tak je u rostlin diskutováno o pravděpodobné roli SUMO-targeted Ubiquitin E3 ligázy 2 (STUBL2) v rámci oprav DPC pomocí úplně nového mechanismu ve spolupráci se Structural Maintenance of Chromosomes 5/6 komplexem (SMC5/6), který zabezpečuje genomovou stabilitu a také se účastní právě oprav DPC (Dvořák Tomašíková *et al.*, 2023).

Pro získání nových informací o tom, jak tyto proteiny zapojené v opravách DPC fungují lze využít různé metody studia meziproteinových interakcí, mezi které patří například kvasinkový dvouhybridový systém (Y2H), afinitní purifikace pomocí hmotnostního spektrometru (AP-MS) a ko-imunoprecipitace (co-IP) (Uhrig, 2006; Yang *et al.*, 2021; Y. Zhang *et al.*, 2009). Avšak nově se hojně začíná využívat metody zvané proximity labeling značení využívající různých katalytických enzymů, které se spojí se studovaným proteinem, nebo dojde k jeho zakotvení do subcelulárního prostoru. Po přidání substrátu odpovídajícího pro daný enzym začne enzym značit proteiny interagující se studovaným proteinem nebo vyskytujícími se v jeho blízkosti, a to tak, že substrát kovalentně naváže právě na tyto proteiny. Substrátem značené proteiny lze na základě afinitní purifikace pomocí streptavidinu izolovat a dále studovat (Xu *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021).

Aby bylo možné využít metody TurboID v rámci sledování interakcí proteinů s metaloproteázou WSS1A nebo s ligázou STUbl2 bylo třeba nejprve vytvořit konstrukt, jehož součástí je gen pro sledovaný protein WSS1A nebo STUbl2 zřizován s genem pro TurboID. Konstrukty byly tvořeny pomocí metody Gateway klonování, jejíž součástí jsou dvě specifické reakce (BP a LR) využívající specifická rekombinační *att* místa sloužící pro výměnu segmentů. Pomocí BP reakce byly připravovány vstupní klony pDONR P4r-P2:*STUbl2* (N fúze) a pDONR P1-P4:*WSS1A* (N fúze a C fúze). Vstupní klony byly transformovány do bakterií *E. coli*. V případě konstruktů pDONR P1-P4:*WSS1A* (N fúze) nedošlo k žádnému nárůstu kolonií na Petriho misce, a to ani po opakovaném provedení BP reakce, kdy byly vyzkoušeny různé koncentrace insertu nebo donorového vektoru, delší časy inkubace pro zajištění větší pravděpodobnosti správné rekombinace, ani po vyzkoušení různých bakteriálních kmenů pro následnou transformaci, do kterých by se mohl konstrukt lépe vložit. Bakteriální kolonie, které obsahovaly konstrukt se selekčním markerem byly schopny vyrůst na médiu. Tyto kolonie byly následně otestovány na přítomnost konstruktů pomocí colony PCR. Konstrukt izolovaný z vybraných bakteriálních kolonií byl podroben Sangerovu sekvenování, pomocí něhož byla testována správnost konstruktů. Bohužel i přes tyto značné snahy se podařilo vytvořit pouze vstupní klon pDONR P1-P4:*WSS1A* (C fúze), takže následující kroky byly prováděny pouze s tímto konstruktem. V případě konstruktů pDONR P4r-P2:*STUbl2* (N fúze) bylo pro PCR reakci vyzkoušeno hned několik primerů, taktéž byla několikrát opakována BP reakce s různými koncentracemi insertu nebo donorového vektoru a různými délkami inkubace, pro zajištění větší pravděpodobnosti správné rekombinace. Bylo vyzkoušeno i několik bakteriálních kmenů pro transformaci. Žádná z těchto provedených změn však nepřinesla úspěch, a ačkoliv bylo zkoušeno velké množství bakteriálních kolonií, které na Petriho miskách narostly, u žádné z nich se po provedení PCR amplifikace nepotvrdila přítomnost vloženého konstruktů. Druhou reakcí byla LR reakce, pomocí které byl připravován expresní klon pK2GW7.0:*WSS1A*:TurboID HA. Expresní klony byly opět transformovány do bakterií *E. coli*. Bakteriální kolonie, které obsahovaly konstrukt se selekčním markerem byly schopny vyrůst na médiu. Tyto kolonie byly následně otestovány na přítomnost konstruktů pomocí colony PCR. Konstrukt izolovaný z vybraných bakteriálních kolonií byl podroben Sangerovu sekvenování, pomocí něhož byla testována správnost konstruktů. Následně byl ověřený izolovaný konstrukt transformován do bakterií *A. tumefaciens*. Bakteriální kolonie, které obsahovaly konstrukt se selekčním markerem byly schopny vyrůst na médiu. I tyto kolonie byly taktéž následně otestovány na přítomnost konstruktů pomocí colony PCR.

V rámci bakalářské práce byl tedy pomocí Gateway technologie byl vytvořen konstrukt obsahující gen pro metaloproteázu WSS1A účastníci se oprav DPC společně s genem pro TurboID afinitní purifikaci. Konstrukt obsahující gen pro STUbl2 se ani po vynaloženém úsilí nepodařilo vytvořit. Vytvořený konstrukt byl následně pomocí metody floral dip zabudován do rostlin *A. thaliana* linie *Col-0* (WT) a *wss1a* (mutantní linie neobsahující gen pro metaloproteázu WSS1A). Semena

transformovaných rostlin byla vyseta na médiu se selekčními antibiotiky, Rostliny, které obsahovaly konstrukt se selekčním markerem byly schopny vyrůst na médiu. Tyto rostliny byly následně přesazeny do substrátu a uchovány ve fytotronové komoře pro další výzkum. Vytvořené transformované rostliny nevykazovaly žádný specifický fenotyp.

Tyto rostliny budou následně ověřovány na přítomnost a správnou funkčnost pomocí metody western blotting. Díky HA-tagu bude ověřena jeho přítomnost v rostlinách a díky biotinylationi jeho správná funkčnost. Pokud se ověří, že je konstrukt v rostlinách přítomen a je plně funkční, rostliny budou moci být následně využity pro analýzy protein-proteinových interakcí pomocí metody TurboID.

Tato analýza umožní studium nových interakcí s metaloproteázou WSS1A, a to především v odpovědi na zebularin, jakožto činitele DPC. Pokud necháme na vytvořené rostliny působit zebularin a posléze biotin, budeme schopni získat interaktom specifický pro zebularin, díky kterému budeme schopni lépe pochopit opravy DPC způsobených zebularinem pomocí WSS1A, které jsou v dnešní době velmi málo prozkoumány. Je třeba dodat, že ke správné identifikaci interagujících proteinů je třeba mít spoustu kontrolních výsledků, která tato tvrzení dokážou. Jako kontrolu lze využít nebiotinylované rostliny a rostliny, na které nebylo působeno zebularinem.



## 7 ZÁVĚR

Byla vypracovaná literární rešerše na téma DNA-proteinových crosslínků u *Arabidopsis thaliana* – základní charakteristika, typy, jejich opravné mechanismy a způsoby, jakým se tyto mechanismy dají sledovat.

V praktické části jsem se zabývala přípravou plasmidových konstruktů nesoucí geny *WSS1A* a *STUBL2* společně s genem pro afinitní purifikaci pomocí TurboID. Jako templát pro PCR amplifikaci posloužila genomická DNA *A. thaliana* linie *Col-0*. Byly získány amplikony obou genů, které byly následně izolovány z agarózového gelu a podrobeny BP reakci (Gateway technologie) s donorovými vektory pDONR P1-P4 a pDONR P4r-P2. Vzniklé vstupní klony byly transformovány do bakterií *E. coli* STBL2. Přítomnost a správnost vstupních klonů byla následně potvrzena pomocí colony PCR a Sangerova sekvenování. Podařilo se mi vytvořit pouze vstupní klon pDONR P1-P4:*WSS1A* (C fúze), takže následující kroky byly prováděny pouze s ním. Dalším krokem byla LR reakce (Gateway technologie), kdy došlo k zaklonování vytvořeného vstupního klonu společně s pENTR TurboID HA P4r-P2 do destinačního vektoru pK2GW7.0. Vzniklý expresní klon pK2GW7.0:*WSS1A*:TurboID HA byl transformován do *E. coli* TOP10. Přítomnost a správnost vstupních klonů byla opět potvrzena pomocí colony PCR a Sangerova sekvenování. Následně byl konstrukt transformován do bakterií *A. tumefaciens* GV3101 a jeho přítomnost byla znovu potvrzena pomocí colony PCR. Dalším krokem byla transformace konstruktů do *A. thaliana* linií *Col-0* a *wss1a* pomocí metody floral dip. Semena sklizená z takto transformovaných rostlin byla vyseta na misce se selekčními antibiotiky.

Cílem práce bylo tedy získat kandidátní rostliny *A. thaliana*, které obsahují geny pro metaloproteázu WSS1 značenou pomocí enzymu TurboID. Takto připravené rostliny s vloženým konstruktem budou sloužit jako prostředek k dalšímu výzkumu, a to především pro studium interakcí mezi proteiny pomocí metody proximity labeling.



## 8 LITERATURA

- Arora, D., Abel, N. B., Liu, C., van Damme, P., Yperman, K., Eeckhout, D., Vu, L. D., Wang, J., Tornkvist, A., Impens, F., Korbei, B., van Leene, J., Goossens, A., de Jaeger, G., Ott, T., Moschou, P. N., van Damme, D. (2020). Establishment of proximity-dependent biotinylation approaches in different plant model systems. *Plant Cell*, 32(11). <https://doi.org/10.1105/TPC.20.00235>
- Auerbach, D., Thaminy, S., Hottiger, M. O., Stagljar, I. (2002). The post-genomic era of interactive proteomics: Facts and perspectives. *Proteomics*, 2(6). [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200206\)2:6](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200206)2:6)
- Augustine, R. C., Vierstra, R. D. (2018). SUMOylation: re-wiring the plant nucleus during stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 45. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.06.006>
- Barker, S., Weinfeld, M., Murray, D. (2005). DNA-protein crosslinks: Their induction, repair, and biological consequences. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 589(2). <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.11.003>
- Berggård, T., Linse, S., James, P. (2007). *Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions*. *Proteomics*, 7(16). <https://doi.org/10.1002/pmic.200700131>
- Bosch, J. A., Chen, C. L., Perrimon, N. (2021). Proximity-dependent labeling methods for proteomic profiling in living cells: An update. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 10(1). <https://doi.org/10.1002/wdev.392>
- Boyko, A., Filkowski, J., Kovalchuk, I. (2005). Homologous recombination in plants is temperature and day-length dependent. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 572(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.12.011>
- Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Feldman, J. L., Perrimon, N., Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, 36(9). <https://doi.org/10.1038/nbt.4201>
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences* 10(6). <https://doi.org/10.3390/ijms10062763>
- Carusillo, A., Mussolino, C. (2020). DNA Damage: From Threat to Treatment. *Cells* 9(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071665>
- Confalonieri, M., Faè, M., Balestrazzi, A., Donà, M., Macovei, A., Valassi, A., Giraffa, G., Carbonera, D. (2014). Enhanced osmotic stress tolerance in *Medicago truncatula* plants overexpressing the

- DNA repair gene MtTdp2 $\alpha$  (tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 116(2). <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0395-y>
- Connelly, J. C., Leach, D. R. F. (2004). Repair of DNA Covalently Linked to Protein. *Molecular Cell* 13(3). [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00056-5)
- Deb ethune, L., Kohlhagen, G., Grandas, A., Pommier, Y. (2002). Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase. *Nucleic Acids Research* 30(5). <https://doi.org/10.1093/nar/30.5.1198>
- Doe, C. L., Ahn, J. S., Dixon, J., Whitby, M. C. (2002). Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36). <https://doi.org/10.1074/jbc.M202120200>
- Donelson Smith, F., Omar, M. H., Nygren, P. J., Soughayer, J., Hoshi, N., Lau, H. T., Snyder, C. G., Branon, T. C., Ghosh, D., Langeberg, L. K., Ting, A. Y., Santana, L. F., Ong, S. E., Navedo, M. F., Scott, J. D. (2018). Single nucleotide polymorphisms alter kinase anchoring and the subcellular targeting of A-kinase anchoring proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(49). <https://doi.org/10.1073/pnas.1816614115>
- Duxin, J. P., Dewar, J. M., Yardimci, H., Walter, J. C. (2014). Repair of a DNA-protein crosslink by replication-coupled proteolysis. *Cell*, 159(2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.024>
- Dvořák Tomařtkov, E., Prochazkova, K., Yang, F., Jemelkova, J., Finke, A., Dorn, A., Said, M., Puchta, H., Pecinka, A. (2023). SMC5/6 complex-mediated SUMOylation stimulates DNA-protein cross-link repair in Arabidopsis. *The Plant Cell*. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad020>
- Elrouby, N., Bonequi, M. V., Porri, A., Coupland, G. (2013). Identification of Arabidopsis SUMO-interacting proteins that regulate chromatin activity and developmental transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(49). <https://doi.org/10.1073/pnas.1319985110>
- Enderle, J., Dorn, A., Beying, N., Trapp, O., Puchta, H. (2019). The protease WSS1A, the endonuclease MUS81, and the phosphodiesterase TDP1 are involved in independent pathways of DNA-protein crosslink repair in plants. *Plant Cell*, 31(4). <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00824>
- Enderle, J., Dorn, A., Puchta, H. (2019). DNA- and DNA-protein-crosslink repair in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20(17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174304>
- Friedberg. (2019). Fixing your damaged and incorrect genes. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. nebo Friedberg, E.C.Fixing Your Damaged and Incorrect Genes; World Scientific: Singapore, 2019

- Gaillard, P. H. L., Noguchi, E., Shanahan, P., Russell, P. (2003). The endogenous Mus81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism. *Molecular Cell*, 12(3). [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00342-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00342-3)
- Geuting, V., Kobbe, D., Hartung, F., Diirr, J., Focke, M., Puchta, H. (2009). Two distinct MUS81-EME1 complexes from arabidopsis process holliday junctions1[w]. *Plant Physiology*, 150(2). <https://doi.org/10.1104/pp.109.136846>
- Gingras, A. C., Aebersold, R., Raught, B. (2005). Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. *Journal of Physiology* 563(1). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.080440>
- Hacker, L., Dorn, A., Puchta, H. (2020). Repair of DNA-protein crosslinks in plants. *DNA Repair* 87. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102787>
- Chatterjee, N., Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 58(5). <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- 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. *Plant Journal*, 89(4). <https://doi.org/10.1111/tpj.13415>
- Choi-Rhee, E., Schulman, H., Cronan, J. E. (2008). Promiscuous protein biotinylation by Escherichia coli biotin protein ligase. *Protein Science*, 13(11). <https://doi.org/10.1110/ps.04911804>
- Ide, H., Nakano, T., Salem, A. M. H., Shoukamy, M. I. (2018). DNA–protein cross-links: Formidable challenges to maintaining genome integrity. *DNA Repair* 71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.024>
- Ide, H., Nakano, T., Shoukamy, M. I., Salem, A. M. H. (2015). Formation, Repair, and Biological Effects of DNA–Protein Cross-Link Damage. *Advances in DNA Repair*. <https://doi.org/10.5772/59683>
- Interthal, H., Champoux, J. J. (2011). Effects of DNA and protein size on substrate cleavage by human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *Biochemical Journal*, 436(3). <https://doi.org/10.1042/BJ20101841>
- Kerbler, S. M., Natale, R., Fernie, A. R., Zhang, Y. (2021). From affinity to proximity techniques to investigate protein complexes in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22137101>
- Khodyreva, S. N., Prasad, R., Ilina, E. S., Sukhanova, M. V., Kutuzov, M. M., Liu, Y., Hou, E. W., Wilson, S. H., Lavrik, O. I. (2010). Apurinic/aprimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP

- lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.1009182107>
- Koizumi, S., Irie, T., Hirayama, S., Sakurai, Y., Yashiroda, H., Naguro, I., Ichijo, H., Hamazaki, J., Murata, S. (2016). The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to compensate for proteasome dysfunction. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.18357>
- Kojima, Y., Machida, Y. J. (2020). DNA–protein crosslinks from environmental exposure: Mechanisms of formation and repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 61(7). <https://doi.org/10.1002/em.22381>
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.06100>
- Li, S., Paulsson, M., Björn, L. O. (2002). Temperature-dependent formation and photorepair of DNA damage induced by UV-B radiation in suspension-cultured tobacco cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(1). [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00277-9](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00277-9)
- Lin, Q., Zhou, Z., Luo, W., Fang, M., Li, M., Li, H. (2017). Screening of proximal and interacting proteins in rice protoplasts by proximity-dependent biotinylation. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00749>
- Mair, A., Bergmann, D. C. (2022). Advances in enzyme-mediated proximity labeling and its potential for plant research. *Plant Physiology*, 188(2). <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab479>
- Mair, A., Xu, S. L., Branon, T. C., Ting, A. Y., Bergmann, D. C. (2019). Proximity labeling of protein complexes and cell type specific organellar proteomes in *Arabidopsis* enabled by TurboID. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.47864>
- Mannuss, A., Dukowic-Schulze, S., Suer, S., Hartung, F., Pacher, M., Puchta, H. (2010). RAD5A, RECQ4A, AND MUS81 have specific functions in homologous recombination and define different pathways of dna repair in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 22(10). <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078568>
- Marconi, D., Ranfley, H., Menck, C. F. M., Ferreira, C. P., Câmara, N. O. S. (2020). Interface of DNA Repair and Metabolism. *Current Tissue Microenvironment Reports*, 1(4). <https://doi.org/10.1007/s43152-020-00018-5>
- Maskey, R. S., Kim, M. S., Baker, D. J., Childs, B., Malureanu, L. A., Jeganathan, K. B., Machida, Y., Van Deursen, J. M., Machida, Y. J. (2014). Spartan deficiency causes genomic instability and progeroid phenotypes. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6744>

- Masters, S. C. (2004). Co-immunoprecipitation from transfected cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 261. <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:337>
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., Koornneef, M. (1998). Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis. *Science* 282(5389). <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>
- Murai, J., Huang, S. Y. N., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshov, J. H., Ji, J., Takeda, S., Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Research*, 72(21). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2753>
- Nakano, T., Xu, X., Salem, A. M. H., Shoukamy, M. I., Ide, H. (2017). Radiation-induced DNA–protein cross-links: Mechanisms and biological significance. *Free Radical Biology and Medicine* 107. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.041>
- Nowicka, A., Tokarz, B., Zwyrtková, J., Dvořák Tomašítková, E., Procházková, K., Ercan, U., Finke, A., Rozhon, W., Poppenberger, B., Otmar, M., Niezgodzki, I., Krečmerová, M., Schubert, I., Pecinka, A. (2020). Comparative analysis of epigenetic inhibitors reveals different degrees of interference with transcriptional gene silencing and induction of DNA damage. *Plant Journal*, 102(1). <https://doi.org/10.1111/tpj.14612>
- Plo, I., Liao, Z. Y., Barceló, J. M., Kohlhagen, G., Caldecott, K. W., Weinfeld, M., & Pommier, Y. (2003). Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA Repair*, 2(10). [https://doi.org/10.1016/S1568-7864\(03\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S1568-7864(03)00116-2)
- Pommier, Y., Barcelo, J. M., Rao, V. A., Sordet, O., Jobson, A. G., Thibaut, L., Miao, Z. H., Seiler, J. A., Zhang, H., Marchand, C., Agama, K., Nitiss, J. L., & Redon, C. (2006). Repair of Topoisomerase I-Mediated DNA Damage. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 81. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(06\)81005-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(06)81005-6)
- Pouliot, J. J., Yao, K. C., Robertson, C. A., Nash, H. A. (1999). Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science*, 286(5439). <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.552>
- Prasad, R., Horton, J. K., Dai, D. P., Wilson, S. H. (2019). Repair pathway for PARP-1 DNA-protein crosslinks. *DNA Repair*, 73. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.11.004>
- Prochazkova, K., Finke, A., Tomašítková, E. D., Filo, J., Bente, H., Dvořák, P., Ovečka, M., Šamaj, J., Pecinka, A. (2022). Zebularine induces enzymatic DNA-protein crosslinks in 45S rDNA heterochromatin of Arabidopsis nuclei. *Nucleic Acids Research*, 50(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1218>

- Prudden, J., Pebernard, S., Raffa, G., Slavin, D. A., Perry, J. J. P., Tainer, J. A., McGowan, C. H., Boddy, M. N. (2007). SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *EMBO Journal*, 26(18). <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601838>
- Qi, Y., & Katagiri, F. (2009). Purification of low-abundance Arabidopsis plasma-membrane protein complexes and identification of candidate components. *Plant Journal*, 57(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03736.x>
- RAVEN, Peter B., Ray Franklin EVERT a Susan E. EICHHORN. *Raven biology of plants*. 8th ed. New York, N.Y.: W.H. Freeman and Company, c2013, xvii, 727, [114] s. ISBN 978-1-4292-1961-7.
- Regairaz, M., Zhang, Y. W., Fu, H., Agama, K. K., Tata, N., Agrawal, S., Aladjem, M. I., Pommier, Y. (2011). Mus81-mediated DNA cleavage resolves replication forks stalled by topoisomerase I-DNA complexes. *Journal of Cell Biology*, 195(5). <https://doi.org/10.1083/jcb.201104003>
- Rhee, H. W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A., Ting, A. Y. (2013). Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science*, 339(6125). <https://doi.org/10.1126/science.1230593>
- Roque, A. C. A., Lowe, C. R. (2007). Affinity chromatography: History, perspectives, limitations and prospects. *Methods in Molecular Biology*, 421.
- Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 196(6). <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>
- Smith, K. C. (1962). Dose dependent decrease in extractability of DNA from bacteria following irradiation with ultraviolet light or with visible light plus dye. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 8(3). [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(62\)90255-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(62)90255-3)
- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology* 25. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- Stingele, J., Bellelli, R., Alte, F., Hewitt, G., Sarek, G., Maslen, S. L., Tsutakawa, S. E., Borg, A., Kjær, S., Tainer, J. A., Skehel, J. M., Groll, M., Boulton, S. J. (2016). Mechanism and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair by the DNA-Dependent Metalloprotease SPRTN. *Molecular Cell*, 64(4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.031>
- Stingele, J., Bellelli, R., Boulton, S. J. (2017). Mechanisms of DNA-protein crosslink repair. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(9). <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.56>
- Stingele, J., Habermann, B., Jentsch, S. (2015). DNA-protein crosslink repair: Proteases as DNA repair enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 40(2). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.012>

- Stingle, J., Schwarz, M. S., Bloemeke, N., Wolf, P. G., Jentsch, S. (2014). A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair. *Cell*, 158(2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.053>
- Sun, Y., Saha, L. K., Saha, S., Jo, U., Pommier, Y. (2020). Debulking of topoisomerase DNA-protein crosslinks (TOP-DPC) by the proteasome, non-proteasomal and non-proteolytic pathways. *DNA Repair*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102926>
- Tang, Y., Ho, M. I., Kang, B. H., Gu, Y. (2022). GBPL3 localizes to the nuclear pore complex and functionally connects the nuclear basket with the nucleoskeleton in plants. *PLoS Biology*, 20(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001831>
- Tang, Y., Huang, A., Gu, Y. (2020). Global profiling of plant nuclear membrane proteome in Arabidopsis. *Nature Plants*, 6(7). <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0700-9>
- Trempe, J. F., Šašková, K. G., Sivá, M., Ratcliffe, C. D. H., Veverka, V., Hoegl, A., Ménade, M., Feng, X., Shenker, S., Svoboda, M., Kozišek, M., Konvalinka, J., Gehring, K. (2016). Structural studies of the yeast DNA damage-inducible protein Ddi1 reveal domain architecture of this eukaryotic protein family. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep33671>
- Trinkle-Mulcahy, L. (2019). Recent advances in proximity-based labeling methods for interactome mapping [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16903.1>
- Tuteja, N., Singh, M. B., Misra, M. K., Bhalla, P. L., Tuteja, R. (2001). Molecular mechanisms of DNA damage and repair: Progress in plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36(4): 337–397. CRC Press LLC. <https://doi.org/10.1080/20014091074219>
- Uhrig, J. F. (2006). Protein interaction networks in plants. *Planta* 224(4). <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0260-x>
- Van Leene, J., Witters, E., Inzé, D., De Jaeger, G. (2008). Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends in Plant Science* 13(10). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.08.002>
- Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(6). <https://doi.org/10.1038/nrm831>
- Whalen, J. M., Dhingra, N., Wei, L., Zhao, X., Freudenreich, C. H. (2020). Relocation of Collapsed Forks to the Nuclear Pore Complex Depends on Sumoylation of DNA Repair Proteins and Permits Rad51 Association. *Cell Reports*, 31(6). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107635>
- Williams, R. S., Williams, J. S., Tainer, J. A. (2007). Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochemistry and Cell Biology* 85(4). <https://doi.org/10.1139/O07-069>



- Xu, Y., Fan, X., Hu, Y. (2021). In vivo interactome profiling by enzyme-catalyzed proximity labeling. *Cell and Bioscience* 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00542-3>
- Yang, X., Wen, Z., Zhang, D., Li, Z., Li, D., Nagalakshmi, U., Dinesh-Kumar, S. P., Zhang, Y. (2021). Proximity labeling: an emerging tool for probing in planta molecular interactions. *Plant Communications* 2(2). <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100137>
- Yoshiyama, K. O., Sakaguchi, K., Kimura, S. (2013). DNA damage response in plants: Conserved and variable response compared to animals. *Biology* 2(4). <https://doi.org/10.3390/biology2041338>
- Yugandhar, K., Gupta, S., Yu, H. (2019). Inferring Protein-Protein Interaction Networks From Mass Spectrometry-Based Proteomic Approaches: A Mini-Review. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 17. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.05.007>
- Zeng, Z., Cortés-Ledesma, F., El Khamisy, S. F., Caldecott, K. W. (2011). TDP2/TTRAP is the major 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase activity in vertebrate cells and is critical for cellular resistance to topoisomerase II-induced DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, 286(1). <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.181016>
- Zhang, H., Xiong, Y., Chen, J. (2020). DNA-protein cross-link repair: What do we know now? *Cell and Bioscience* 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0366-z>
- Zhang, Y., Gao, P., Yuan, J. (2009). Plant protein-protein interaction network and interactome. *Current Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.2174/138920210790218016>
- Zhang, Y., Li, Y., Yang, X., Wen, Z., Nagalakshmi, U., Dinesh-Kumar, S. P. (2020). TurboID-based proximity labeling for in planta identification of protein-protein interaction networks. *Journal of Visualized Experiments*, 2020(159). <https://doi.org/10.3791/60728>
- Zhang, Y., Song, G., Lal, N. K., Nagalakshmi, U., Li, Y., Zheng, W., Huang, P. jui, Branon, T. C., Ting, A. Y., Walley, J. W., Dinesh-Kumar, S. P. (2019). TurboID-based proximity labeling reveals that UBR7 is a regulator of N NLR immune receptor-mediated immunity. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11202-z>



# 9 PŘÍLOHY

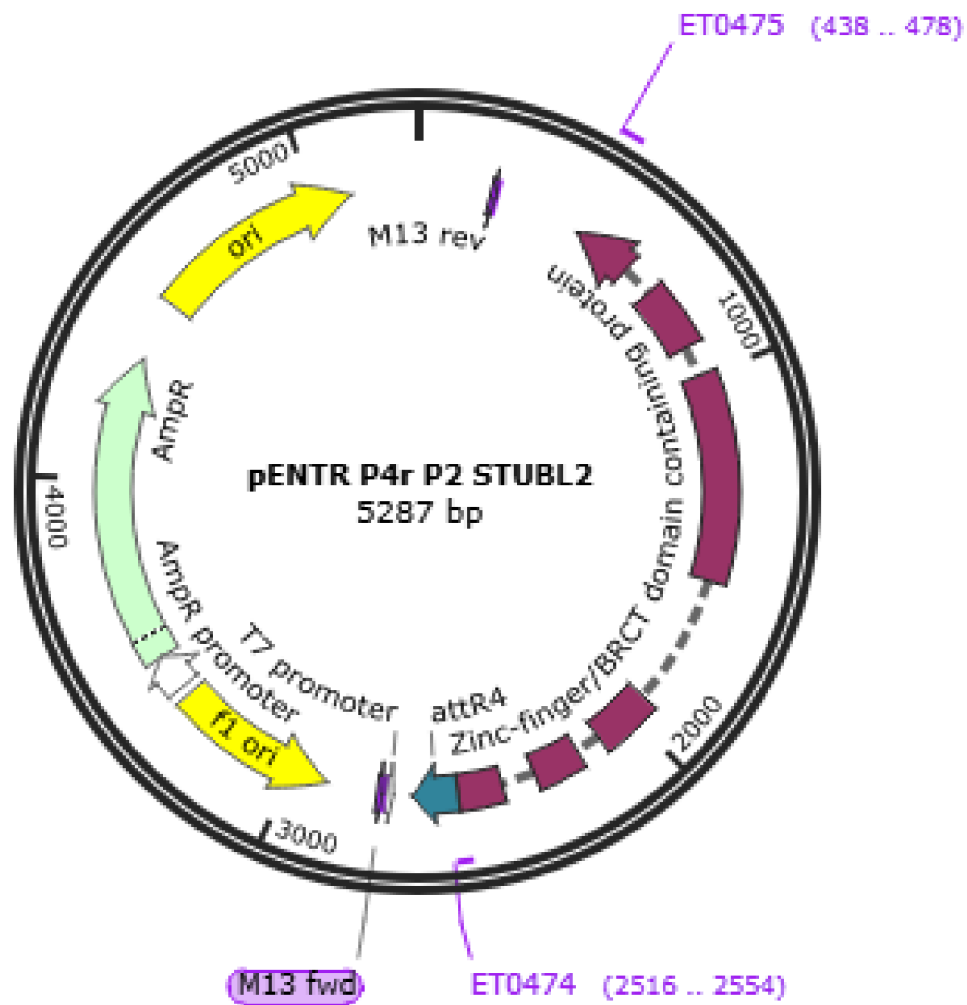
Příloha 1: Mapa pENTR P1-P4:WSS1A.

Created by SnapGene



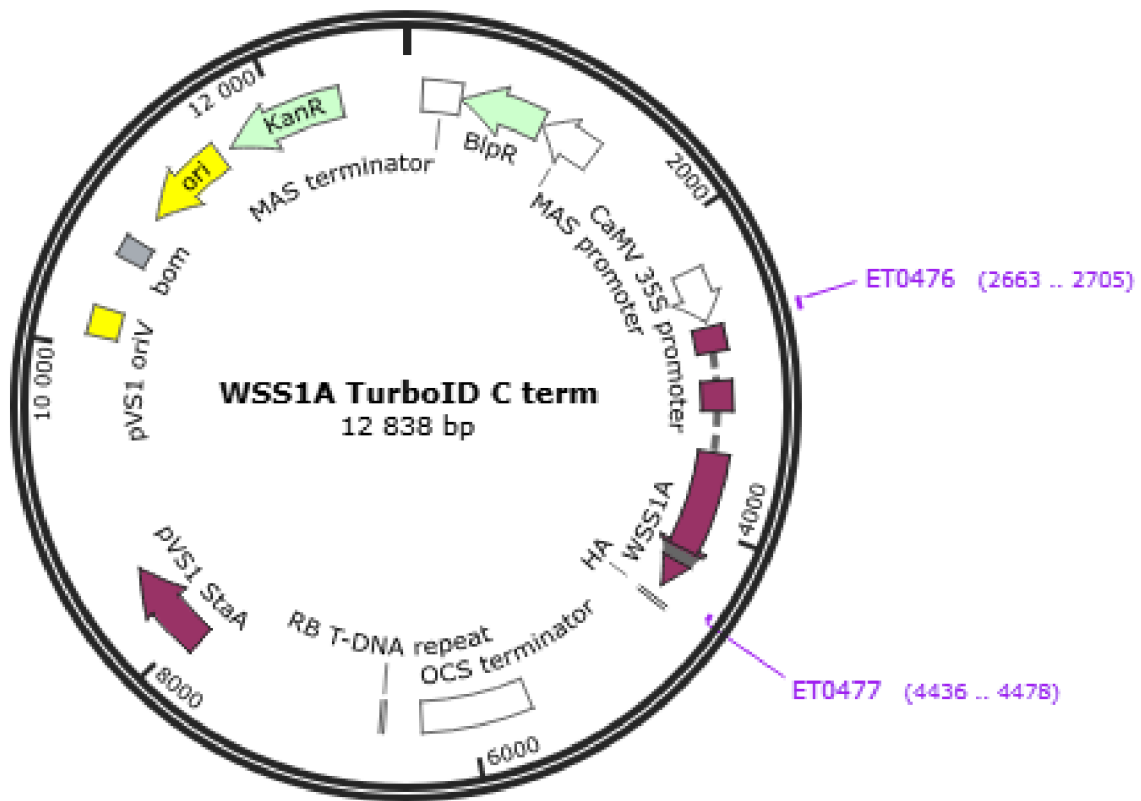
**Příloha 2:** Mapa pENTR P4r-P2:STUBL2.

Created by SnapGene



**Příloha 3:** Mapa pENTR P1-P4:WSS1A:TurboID.

Created by SnapGene



**Příloha 4:** Srovnání sekvence pENTR P1-P4:WSS1A s výsledkem ze sekvenování kolonie 2 s insertem pENTR P1-P4:WSS1A (forward primer).

pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	----- GATTGGGTACCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTACTGATAGTGACC
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	----- TGTYCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTT
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	-----ATGAGTTCGGCGAATTTGGAAGATTTGAACA GTACAAAAAAGCAGGCTCGATGAGTTCGGCGAATTTGGAAGATTTGAACA *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	AGGTCTGGGAAATAAAGGCTTTGAAGAGGAAACCTAGAGAAGATGAAGCG AGGTCTGGGAAATAAAGGCTTTGAAGAGGAAACCTAGAGAAGATGAAGCG *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	AGGAAGATTCTGGAGAAAGTAGCTAATCAGGTT CAGCCGATTATGACTAG AGGAAGATTCTGGAGAAAGTAGCTAATCAGGTT CAGCCGATTATGACTAG *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	ACGAAAATGGCGCGTCAAGCTTCTCTCTGAATTCTGGTAATTTAAAGGGT ACGAAAATGGCGCGTCAAGCTTCTCTCTGAATTCTGGTAATTTAAAGGGT *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	TTTTGTCAAATCGTCTATTTATTAAGATTTGAATCGATTAGTGGCCTGTG TTTTGTCAAATCGTCTATTTATTAAGATTTGAATCGATTAGTGGCCTGTG *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	GAAGAATGATTGAAAGTATTGTTGAATCGATAAGTGGTTGTGGAAGAATG GAAGAATGATTGAAAGTATTGTTGAATCGATAAGTGGTTGTGGAAGAATG *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	ATTGAAAGTATTGACTTTTAGGGTTCATGATGTTTCCATTGTTTCATGATG ATTGAAAGTATTGACTTTTAGGGTTCATGATGTTTCCATTGTTTCATGATG *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	TTTGTTTTCGATTTTCGAAATTGCAGCCCAACAAATCCAAGGCTTTTGGGG TTTGTTTTCGATTTTCGAAATTGCAGCCCAACAAATCCAAGGCTTTTGGGG *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	GTGAATGTAATAGAGGCGTGCAAGTCAAATTGAGGCTTAGGAGGGTAAA GTGAATGTAATAGAGGCGTGCAAGTCAAATTGAGGCTTAGGAGGGTAAA *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	CCATGATTTAGATTTCTTATCGTATCATGAAATTCGACACCATGCTCC CCATGATTTAGATTTCTTATCGTATCATGAAATTCGACACCATGCTCC *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	ACGAGCTTTGCCACAACGCTCATGGTCCTCATAACGCAAGTTTCTATAAG ACGAGCTTTGCCACAACGCTCATGGTCCTCATAACGCAAGTTTCTATAAG *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	CTTTGGGATGAACTTCGAAAGGTATCTCGATTCTTATTTGACCACTCCAT CTTTGGGATGAACTTCGAAAGGTATCTCGATTCTTATTTGACCACTCCAT *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	CATTGAAGCTGATGTTTAAAGAAATTAACATACATTTTGAGCTTAAGAGCT CATTGAAGCTGATGTTTAAAGAAATTAACATACATTTTGAGCTTAAGAGCT *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1A fwd	AGTAAAGTTTAGAGTTCCTCTACCACCATGGCTTATTTGAGATGCATCAA AGTAAAGTTTAGAGTTCCTCTACCACCATGGCTTATTTGAGATGCATCAA

```

*****
pENTRWSS1A      TAGTCAAAAATGTTTCTTATCTAGGGGATAACAGTCTGTTGGCTATTGAA
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd TAGTCAAAAATGTTTCTTATCTAGGGGATAACAGTCTGTTGGCTATTGAA
*****

pENTRWSS1A      GAAAAATGATTTGAAAATTTGGCTACTTTTCTAGTTGCATTACCAATGCT
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd GAAAAATGATTTGAAAATTTGGCTACTTTTCTAGTTGCATTACCAATGCT
*****

pENTRWSS1A      TCATTTCTCTGGGGAAACAGTGTTAAACTAATTCCATTACATCTAGGAAT
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd TCATTTCTCTGGGGAAACAGTGTTAAACTAATTCCATTACATCTAGGAAT
*****

pENTRWSS1A      GCGAGGAGTTGATGTCAAAGGGTATTACAGGGACGGGACAGGGATTTGAT
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd GCGAGGAGTTGATGTCAAAGGGTATTACAGGGACGGGACAGGGATTTGAT
*****

pENTRWSS1A      ATGCCTGGTAAGCGTTTGGGTGGACTTCTCGTCAGCCTTCTCTATCATT
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd ATGCCTGGTAAGCGTTTGGGTGGA-----
*****

pENTRWSS1A      TCTCAGAGCAACTGCAGCTACAGCAGCAGAAAAAGAGTGCCTGCGGGAA
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

pENTRWSS1A      CTCTTTTACCTTCAGGACCTCAACGCTTGGTGGTGTATAGCAGCATTATG
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

pENTRWSS1A      TCAGATCTTAGTCCAATTCAGGCTGCTGCAATGGCTGCAGAAAGCGTTT
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

pENTRWSS1A      ACTTGATGATATTTGGTGTGGTTCCCAATCCACAGATGCTTTAGAAGATG
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

pENTRWSS1A      AAGAGAATGATAGTGACACATATAAGGAACCTGTTTCCATCAGGGAACT
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

pENTRWSS1A      TGTACGAGCGTGAATGGAAAGTCAGTAAAACGATGTAATAGCTGGTCCAA
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

pENTRWSS1A      TGCCCATCTTGTCTCCATCTTCCAGTCATCAACAGGGATCAGATGTCA
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

pENTRWSS1A      TTGATTTGACTGAAGAATCTTTTGAATAAGATGTACTAAAAGAAATCGC
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

pENTRWSS1A      AGCCCAGGTGATCAGGGTCTTCTTGTGCCAAAGATGTACCGAACGCTGG
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

pENTRWSS1A      TGTCATGAAGTCATCGATTCTTTGCCATCGACGAGTTACAATGCAAACC
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

pENTRWSS1A      AAAGCAGAGAAGAATCCACAATGTGGGAGTGTGCAGAAATGCACCTTATTG
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

pENTRWSS1A      AACCCGGTAAGTCTTCCCTTAAGAGTGATAAACTTGAAGCTTCTTGTGTG
colony2pENTRP1-P4WSS1Afd -----

```

pENTRWSS1A  
colony2pENTRP1-P4WSS1Afwd

CTCTATACTGTTTTTTCATTATCGGTCTTGTTCCTACCAGTCATTG  
-----

pENTRWSS1A  
colony2pENTRP1-P4WSS1Afwd

GCTCCAATATGTGAGCTATGCACTGCCGCAAAGCAAAGGAAAGGGAGAT  
-----

pENTRWSS1A  
colony2pENTRP1-P4WSS1Afwd

GAAGCACAAGTCTGGTCTTGCAAATCTGCACGCTTGAAAATGAGGTGA  
-----

pENTRWSS1A  
colony2pENTRP1-P4WSS1Afwd

AGTTAGAGAAATGTGAGGCTTGTGGTCAGTGGAGGTACTCGTATGGAGCA  
-----

pENTRWSS1A  
colony2pENTRP1-P4WSS1Afwd

CCATTGTCAACTGGTGCTCCTAATGTCGGCACT  
-----

**Příloha 5:** Srovnání sekvence pENTR P1-P4:WSS1A s výsledkem ze sekvenování kolonie 2 s insertem pENTR P1-P4:WSS1A (reverse primer).

pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	ATGAGTTCGGCGAATTTGGAAGATTTGAACAAGGTCTGGGAAATAAAGGC -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TTTGAAGAGGAAACCTAGAGAAGATGAAGCGAGGAAGATTCTGGAGAAAG -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TAGCTAATCAGGTTTCAGCCGATTATGACTAGACGAAAATGGCGCGTCAAG -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	CTTCTCTCTGAATTCGGTAATTTAAAGGGTTTTTGTCAAATCGTCTATT -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TATTAAAGATTTGAATCGATTAGTGGCTGTGGAAGAATGATTGAAAGTAT -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TGTTGAATCGATAAGTGGTTGTGGAAGAATGATTGAAAGTATTGACTTTT -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	AGGGTTCATGATGTTTCCATTGTTTCATGATGTTTGTTCGATTTCGAAA -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TTGCAGCCCAACAAATCCAAGGCTTTTGGGGTGAATGTAAATAGAGGCG -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TGCAAGTGAATTTGAGGCTTAGGAGGGTAAACCATGATTTAGATTTCTTA -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TCGTATCATGAAATTTCTCGACACCATGCTCCACGAGCTTTGCCACAACGC -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TCATGGTCTCATAACGCAAGTTTCTATAAGCTTTGGGATGAACTTCGAA -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	AGGTATCTCGATTCTTATTTGACCACTCCATCATTGAAGCTGATGTTTAA -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	GAAATTAACATACATTTTGGCTTAAGAGCTAGTAAAGTTTAGAGTTTCTT -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	CTACCACCATGGCTTATTTGAGATGCATCAATAGTCAAAAATGTTTCTTA -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TCTAGGGGATAACAGTCTGTTGGCTATTGAAGAAAAATGATTTGAAAATT -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TGGCTACTTTTCTAGTTGCATTACCAATGCTTCATTTCTCTGGGGAAACA -----

pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	GTGTTAAACTAATTCCATTACATCTAGGAATGCGAGGAGTTGATGTCAA -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	GGGTATTACAGGGACGGGACAGGGATTTGATATGCCTGGTAAGCGTTTGG -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	GTGGACTTTCTCGTCAGCCTTCTCTATCATTTCTCAGAGCAACTGCAGCT -----
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	ACAGCAGCAGAAAAAGAGTGCGTGCGGGAACCTTTTACCTTCAGGACC -----AGCAGAAAAAGAGTGCGTGCGGGAACCTTTTACCTTCAGGACC *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TCAACGCTTTGGTGGTGATAGCAGCATTATGTCAGATCTTAGTCCAATTC TCAACGCTTTGGTGGTGATAGCAGCATTATGTCAGATCTTAGTCCAATTC *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	AGGCTGCTGCAATGGCTGCAGAAAGGCGTTTACTTGATGATATTTGGTGT AGGCTGCTGCAATGGCTGCAGAAAGGCGTTTACTTGATGATATTTGGTGT *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	GGTTCCTCAATCCACAGATGCTTTAGAAGATGAAGAGAATGATAGTGACAC GGTTCCTCAATCCACAGATGCTTTAGAAGATGAAGAGAATGATAGTGACAC *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	ATATAAGGAACCTGTTTCCATCAGGGAACCTTGACGAGCGTGAATGGAA ATATAAGGAACCTGTTTCCATCAGGGAACCTTGACGAGCGTGAATGGAA *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	AGTCAGTAAACGATGTAATAGCTGGTCCAATGCCATCTTGTCTCCCA AGTCAGTAAACGATGTAATAGCTGGTCCAATGCCATCTTGTCTCCCA *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TCTTCCAGTCATCAACAGGGATCAGATGTCATTGATTTGACTGAAGAATC TCTTCCAGTCATCAACAGGGATCAGATGTCATTGATTTGACTGAAGAATC *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TTTTGAAATAAGATGTACTAAAAGAAATCGCAGCCCAGGTGATCAGGGTC TTTTGAAATAAGATGTACTAAAAGAAATCGCAGCCCAGGTGATCAGGGTC *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	CTTCTTGTGCCAAAGATGTACCGAACGCTGGTGTGTCATGAAGTCATCGATT CTTCTTGTGCCAAAGATGTACCGAACGCTGGTGTGTCATGAAGTCATCGATT *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	CCTTTGCCATCGACGAGTTACAATGCAAACCAAAGCAGAGAAGAATCCAC CCTTTGCCATCGACGAGTTACAATGCAAACCAAAGCAGAGAAGAATCCAC *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	AATGTGGGAGTGTGCAGAATGCACCTTATTGAACCCGTAAGTCTTCCTT AATGTGGGAGTGTGCAGAATGCACCTTATTGAACCCGTAAGTCTTCCTT *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	AAGAGTGATAAACTTGAAGCTTCTTGTGCTCTATACTGTTTTTTTTCAT AAGAGTGATAAACTTGAAGCTTCTTGTGCTCTATACTGTTTTTTTTCAT *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TATCGGTCTTGTGTTTTCTCCTACCAGTCATTGGCTCCAATATGTGAGCTAT TATCGGTCTTGTGTTTTCTCCTACCAGTCATTGGCTCCAATATGTGAGCTAT *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	GCACTGCCGCAAAGCCAAAGGAAAGGGAGATGAAGCACAAAGTCTGGTCT GCACTGCCGCAAAGCCAAAGGAAAGGGAGATGAAGCACAAAGTCTGGTCT *****



pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TGCAAATTCAGCAGCTTGAAAATGAGGTGAAGTTAGAGAAATGTGAGGC TGCAAATTCAGCAGCTTGAAAATGAGGTGAAGTTAGAGAAATGTGAGGC *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	TTGTGGTCAGTGGAGGTACTCGTATGGAGCACCATTGTCAACTGGTGCTC TTGTGGTCAGTGGAGGTACTCGTATGGAGCACCATTGTCAACTGGTGCTC *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	CTAATGTCGGCACT----- CTAATGTCGGCACTCACCCAACCTTTCTATACAAAGTTGGCATTATAAGA *****
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	----- AAGCATTTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAAA
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	----- TAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGCAGGGCGGCCGATATCGAATTC
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	----- CTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGA
pENTRWSS1A colony2pENTRP1-P4WSS1Arev	----- GCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTAA

**Příloha 6:** Srovnání sekvence pENTR P1-P4:WSS1A s výsledkem ze sekvenování kolonie 5 s insertem pENTR P1-P4:WSS1A (forward primer).

```

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd GGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTYCGTTGCA

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd ACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAG

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd -----ATGAGTTCGGCGAATTTGGAAGATTTGAACAAGGTCTGGGAA
CAGGCTCGATGAGTTCGGCGAATTTGGAAGATTTGAACAAGGTCTGGGAA
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd ATAAAGGCTTTGAAGAGGAAACCTAGAGAAGATGAAGCGAGGAAGATTCT
ATAAAGGCTTTGAAGAGGAAACCTAGAGAAGATGAAGCGAGGAAGATTCT
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd GGAGAAAGTAGCTAATCAGGTTCAGCCGATTATGACTAGACGAAAATGGC
GGAGAAAGTAGCTAATCAGGTTCAGCCGATTATGACTAGACGAAAATGGC
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd GCGTCAAGCTTCTCTCTGAATTCTGGTAATTTAAAGGGTTTTGTCAAAT
GCGTCAAGCTTCTCTCTGAATTCTGGTAATTTAAAGGGTTTTGTCAAAT
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd CGTCTATTTATTAAGATTTGAATCGATTAGTGGCTGTGGAAGAATGATT
CGTCTATTTATTAAGATTTGAATCGATTAGTGGCTGTGGAAGAATGATT
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd GAAAGTATTGTTGAATCGATAAGTGGTTGTGGAAGAATGATTGAAAGTAT
GAAAGTATTGTTGAATCGATAAGTGGTTGTGGAAGAATGATTGAAAGTAT
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd TGACTTTTAGGGTTCATGATGTTTCCATGTTTCATGATGTTTGTTTTCGA
TGACTTTTAGGGTTCATGATGTTTCCATGTTTCATGATGTTTGTTTTCGA
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd TTTCGAAATTGCAGCCCAACAAATCCAAGGCTTTTGGGGTGAATGTAAA
TTTCGAAATTGCAGCCCAACAAATCCAAGGCTTTTGGGGTGAATGTAAA
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd TAGAGGCGTGCAAGTGAAATTGAGGCTTAGGAGGGTAAACCATGATTTAG
TAGAGGCGTGCAAGTGAAATTGAGGCTTAGGAGGGTAAACCATGATTTAG
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd ATTTCTTATCGTATCATGAAATTCGACACCATGCTCCACGAGCTTTGC
ATTTCTTATCGTATCATGAAATTCGACACCATGCTCCACGAGCTTTGC
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd CACAACGCTCATGGTCCTCATAACGCAAGTTTCTATAAGCTTTGGGATGA
CACAACGCTCATGGTCCTCATAACGCAAGTTTCTATAAGCTTTGGGATGA
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd ACTTCGAAAGGTATCTCGATTCTTATTTGACCACTCCATCATTGAAGCTG
ACTTCGAAAGGTATCTCGATTCTTATTTGACCACTCCATCATTGAAGCTG
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd ATGTTTAAAGAAATTAACATACATTTTGAGCTTAAGAGCTAGTAAAGTTTA
ATGTTTAAAGAAATTAACATACATTTTGAGCTTAAGAGCTAGTAAAGTTTA
*****

pENTRWSS1A -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Afd GAGTTCCTCTACCACCATGGCTTATTTGAGATGCATCAATAGTCAAAAAAT
GAGTTCCTCTACCACCATGGCTTATTTGAGATGCATCAATAGTCAAAAAAT
*****

```

pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	GTTTCTTATCTAGGGGATAACAGTCTGTTGGCTATTGAAGAAAAATGATT GTTTCTTATCTAGGGGATAACAGTCTGTTGGCTATTGAAGAAAAATGATT *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	TGAAAATTTGGCTACTTTTCTAGTTGCATTACCAATGCTTCATTTCTCTG TGAAAATTTGGCTACTTTTCTAGTTGCATTACCAATGCTTCATTTCTCTG *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	GGGAAACAGTGTTAAACTAATTCCATTACATCTAGGAATGCGAGGAGTTG GGGAAACAGTGTTAAACTAATTCCATTACATCTAGGAATGCGAGGAGTTG *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	ATGTCAAAGGGTATTACAGGGACGGGACAGGGATTTGATATGCCTGGTAA ATGTCAAAGGGTATTACAGGGACGGGACAGGGATTTGATATGCCTGGTAA *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	GCCTTTGGGTGGACTTTCTCGTCAGCCTTCTCTATCATTTCTCAGAGCAA GCCTTTGGGTGGACTTTCTCGTCAGCCTTCTCTATC----- *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	CTGCAGCTACAGCAGCAGAAAAAGAGTGCCTGCGGGAACCTTTTTACCT -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	TCAGGACCTCAACGTCTTGGTGGTGATAGCAGCATTATGTCAGATCTTAG -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	TCCAATTCAGGCTGCTGCAATGGCTGCAGAAAGCGTTTACTTGATGATA -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	TTTGGTGTGGTTCCCAATCCACAGATGCTTTAGAAGATGAAGAGAATGAT -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	AGTGACACATATAAGGAACTGTTTCCATCAGGGAACTTGTACGAGCGT -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	GAATGGAAAGTCAGTAAAACGATGTAATAGCTGGTCCAATGCCATTCTT -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	GTCCTCCATCTTCCAGTCATCAACAGGGATCAGATGTCATTGATTTGACT -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	GAAGAATCTTTTGAATAAGATGTACTAAAAGAAATCGCAGCCCAGGTGA -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	TCAGGGTCCTTCTTGTGCCAAAGATGTACCGAACGCTGGTGTCTATGAAGT -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	CATCGATTCTTTGCCATCGACGAGTTACAATGCAAACCAAAGCAGAGAA -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	GAATCCACAATGTGGGAGTGTGCAGAATGCACCTTATTGAACCCGGTAA -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Afd	TCTTCTTAAGAGTGTATAAACTTGAAGCTTCTTGTGTCTCTATACTGT -----

pENTRWSS1A  
colony5pENTRP1-P4WSS1Afwd

TTTTTCATTATCGGTCTTGTTTTCTCCTACCAGTCATTGGCTCCAATATG  
-----

pENTRWSS1A  
colony5pENTRP1-P4WSS1Afwd

TGAGCTATGCACTGCCGCAAAGCCAAAGGAAAGGGAGATGAAGCACAAG  
-----

pENTRWSS1A  
colony5pENTRP1-P4WSS1Afwd

TCTGGTCTTGCAAATTCTGCACGCTTGAAAATGAGGTGAAGTTAGAGAAA  
-----

pENTRWSS1A  
colony5pENTRP1-P4WSS1Afwd

TGTGAGGCTTGTGGTCAGTGGAGGTACTCGTATGGAGCACCATTGTCAAC  
-----

pENTRWSS1A  
colony5pENTRP1-P4WSS1Afwd

TGGTGCTCCTAATGTCGGCACT  
-----

**Příloha 7:** Srovnání sekvence pENTR P1-P4:WSS1A s výsledkem ze sekvenování kolonie 5 s insertem pENTR P1-P4:WSS1A (reverse primer).

pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	ATGAGTTCGGCGAATTTGGAAGATTTGAACAAGGTCTGGGAAATAAAGGC -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TTTGAAGAGGAAACCTAGAGAAGATGAAGCGAGGAAGATTCTGGAGAAAG -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TAGCTAATCAGGTTCCAGCCGATTATGACTAGACGAAAATGGCGCGTCAAG -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	CTTCTCTCTGAATTTCTGGTAATTTAAAGGGTTTTTGTCAAATCGTCTATT -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TATTTAAAGATTTGAATCGATTAGTGGCTGTGGAAGAATGATTGAAAGTAT -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TGTTGAATCGATAAGTGGTTGTGGAAGAATGATTGAAAGTATTGACTTTT -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	AGGGTTCATGATGTTTCCATTGTTTCATGATGTTTGTTCGATTTGCGAAA -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TTGCAGCCCAACAAATCCAAGGCTTTTGGGGTGAATGTAAATAGAGGCG -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TGCAAGTGAAATTGAGGCTTAGGAGGGTAAACCATGATTTAGATTTCTTA -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TCGTATCATGAAATTTCTCGACACCATGCTCCACGAGCTTTGCCACAACGC -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TCATGGTCTCATAACGCAAGTTTCTATAAGCTTTGGGATGAACTTCGAA -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	AGGTATCTCGATTCTTATTTGACCACTCCATCATTGAAGCTGATGTTTAA -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	GAAATTAACATACATTTTGGAGCTTAAGAGCTAGTAAAGTTTAGAGTTCCT -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	CTACCACCATGGCTTATTTGAGATGCATCAATAGTCAAAAATGTTTCTTA -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TCTAGGGGATAACAGTCTGTTGGCTATTGAAGAAAAATGATTTGAAAATT -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TGGCTACTTTTCTAGTTGCATTACCAATGCTTCATTTCTCTGGGGAAACA -----

pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	GTGTTAAACTAATTCCATTACATCTAGGAATGCGAGGAGTTGATGTCAA -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	GGGTATTACAGGGACGGGACAGGGATTTGATATGCCTGGTAAGCGTTTGG -----
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	GTGGACTTTCTCGTCAGCCTTCTCTATCATTCTCAGAGCAACTGCAGCT -----AGAGCAACTGCAGCT *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	ACAGCAGCAGAAAAAGAGTGCCTGCGGGAACTCTTTTACCTTCAGGACC ACAGCAGCAGAAAAAGAGTGCCTGCGGGAACTCTTTTACCTTCAGGACC *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TCAACGCTCTTGGTGGTGATAGCAGCATTATGTCAGATCTTAGTCCAATTC TCAACGCTCTTGGTGGTGATAGCAGCATTATGTCAGATCTTAGTCCAATTC *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	AGGCTGCTGCAATGGCTGCAGAAAGGCGTTTACTTGATGATATTTGGTGT AGGCTGCTGCAATGGCTGCAGAAAGGCGTTTACTTGATGATATTTGGTGT *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	GGTTCCCAATCCACAGATGCTTTAGAAGATGAAGAGAATGATAGTGACAC GGTTCCCAATCCACAGATGCTTTAGAAGATGAAGAGAATGATAGTGACAC *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	ATATAAGGAACCTGTTTCCATCAGGGAACTTGACGAGCGTGAATGGAA ATATAAGGAACCTGTTTCCATCAGGGAACTTGACGAGCGTGAATGGAA *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	AGTCAGTAAAACGATGTAATAGCTGGTCCAATGCCATTCTTGTCTCCA AGTCAGTAAAACGATGTAATAGCTGGTCCAATGCCATTCTTGTCTCCA *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TCTTCCAGTCATCAACAGGGATCAGATGTCATTGATTTGACTGAAGAATC TCTTCCAGTCATCAACAGGGATCAGATGTCATTGATTTGACTGAAGAATC *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TTTTGAAATAAGATGTACTAAAAGAAATCGCAGCCCAGGTGATCAGGGTC TTTTGAAATAAGATGTACTAAAAGAAATCGCAGCCCAGGTGATCAGGGTC *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	CTTCTTGTCGCAAAGATGTACCGAACGCTGGTGTGTCATGAAGTCATCGATT CTTCTTGTCGCAAAGATGTACCGAACGCTGGTGTGTCATGAAGTCATCGATT *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	CCTTTGCCATCGACGAGTTACAATGCAAACCAAAGCAGAGAAGAATCCAC CCTTTGCCATCGACGAGTTACAATGCAAACCAAAGCAGAGAAGAATCCAC *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	AATGTGGGAGTGTGCAGAATGCACCTTATTGAACCCGGTAAGTCTTCCTT AATGTGGGAGTGTGCAGAATGCACCTTATTGAACCCGGTAAGTCTTCCTT *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	AAGAGTGATAAACTTGAAGCTTCTTGTGTCTCTATACTGTTTTTTCAT AAGAGTGATAAACTTGAAGCTTCTTGTGTCTCTATACTGTTTTTTCAT *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	TATCGGTCTTGTTCCTTCTCCTACCAGTCATTGGCTCCAATATGTGAGCTAT TATCGGTCTTGTTCCTTCTCCTACCAGTCATTGGCTCCAATATGTGAGCTAT *****
pENTRWSS1A colony5pENTRP1-P4WSS1Arev	GCACTGCCGCAAAGCCAAAGGAAAGGGAGATGAAGCACAAAGTCTGGTCT GCACTGCCGCAAAGCCAAAGGAAAGGGAGATGAAGCACAAAGTCTGGTCT

```

*****
pENTRWSS1A      TGCAAATTCTGCACGCTTGAAAATGAGGTGAAGTTAGAGAAATGTGAGGC
colony5pENTRP1-P4WSS1Arev TGCAAATTCTGCACGCTTGAAAATGAGGTGAAGTTAGAGAAATGTGAGGC
*****

pENTRWSS1A      TTGTGGTCAGTGGAGGTACTCGTATGGAGCACCATTGTCAACTGGTGCTC
colony5pENTRP1-P4WSS1Arev TTGTGGTCAGTGGAGGTACTCGTATGGAGCACCATTGTCAACTGGTGCTC
*****

pENTRWSS1A      CTAATGTCGGCACT-----
colony5pENTRP1-P4WSS1Arev CTAATGTCGGCACTCACCCAACCTTTTCTATACAAAGTTGGCATTATAAGA
*****

pENTRWSS1A      -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Arev AAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAAA

pENTRWSS1A      -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Arev TAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGCAGGGCGGCCGGATATCGAATTC

pENTRWSS1A      -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Arev CTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTC TAGAGCGGCCGCCACCGGGTGGGA

pENTRWSS1A      -----
colony5pENTRP1-P4WSS1Arev GCTCCAGC

```