

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalárska práca**

**Olomouc 2022**

**Tereza Dostálová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Vytvoření populace pro analýzu homologní  
rekombinace v různých genomických pozicích  
u huseníčku rolního**

**Bakalárska práca**

**Tereza Dostálová**

Študijný program: Biológia

Študijný odbor: Molekulárna a bunková biológia

Forma štúdia: Prezenčná

**Olomouc 2022    Vedúca práce: Mgr. Eva Dvořák Tomašíková, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Tereza DOSTÁLOVÁ  
Osobní číslo: R19824  
Studijní program: B1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Vytvoření populace pro analýzu frekvence homologní rekombinace v různých genomických pozicích u huseníčku rolního  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

1. Zpracování literární rešerše na téma homologní rekombinace.
2. Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* existujícími konstrukty pro analýzu homologní rekombinace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Selektce transformantů na médiu s příslušnými selekčními antibiotiky.
4. Určení počtu kopií a genomického lokusu v příslušných liniích.
5. Zvládnutí *in vitro* technik používaných při práci s *Arabidopsis* ve sterilním prostředí.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Jazyk zpracování: Slovenština

Seznam doporučené literatury:

- Díaz M, Pečinková P, Nowicka A, Baroux CC, Sakamoto T, Gandha PY, Jeřábková H, Matsunaga S, Grossniklaus U, Pecinka A, et al (2019) The SMC5/6 complex subunit NSE4A is involved in DNA damage repair and seed development. *Plant Cell* 31: 1579–1597
- Liu CH, Finke A, Díaz M, Rozhon W, Poppenberger B, Baubec T, Pecinka A (2015) Repair of DNA damage induced by the cytidine analog zebularine requires ATR and ATM in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27: 1788–1800
- Orel N, Kyryk A, Puchta H (2003) Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *Plant J* 35: 604–612
- Schuermann D, Molinier J, Fritsch O, Hohn B (2005) The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends Genet* 21: 172–181
- 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

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Eva Dvořák Tomašíková, Ph.D.

ÚEB – CR Haná

Datum zadání bakalářské práce: 15. dubna 2021  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUČI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc - Holice  
tel.: +420 585 634 901

L.S.

-2-

16 -04- 2021

---

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

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 16. dubna 2021

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu na tému Vytvoření populace pro analýzu frekvence homologní rekombinace v různýchch genomických pozicích u huseníčku rolního, spracovala samostatne s použitím uvedených literárnych zdrojov a pod vedením Mgr. Evy Dvořák Tomašíkovej, Ph.D.

V Olomouci dňa: 8. 4. 2022

.....

Dostálová Tereza

## **Bibliografické údaje**

**Meno a priezvisko autora:** Tereza Dostálová

**Názov práce:** Vytvorenie populácie pro analýzu frekvencie homologní rekombinácie v rôznych genomických pozíciách u huseníčku rolného

**Typ práce:** Bakalárska

**Pracovisko:** Katedra buněčné biologie a genetiky

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

**Rok obhajoby práce:** 2022

### **Abstrakt:**

Cieľom tejto práce, bolo transformovať *Arabidopsis thaliana* konštruktmi pomocou *Agrobacterium tumefaciens* a vyselektovať rastliny s T-DNA. V rámci práce boli vytvorené heterozygotné semená T1 generácie, ktoré obsahujú konštrukty DU.GUS a IU.GUS a semená T2 generácie s konštruktom DGU.US.

Ďalším predmetom tejto práce bolo zistiť, či sa gén *dpcr3-2* podieľa na homolognej rekombinácii. Podľa teórie pokiaľ sa gén *dpcr3-2* podieľa na HR, tak by sa v mutantovi malo vyskytovať menej modrých bodiek, ktoré je možné pozorovať v mladých listoch *Arabidopsis thaliana* po histochemickom farbení, ako vo WT. WT totižto nemá funkčný gén a teda homologna rekombinácia nemôže prebiehať rovnako efektívne ako v mutantovi. Analýzou frekvencie homolognej rekombinácie nebolo možné s istotou určiť či sa gén *dpcr3-2* podieľa na homolognej rekombinácii.

**Kľúčové slová:** *Arabidopsis thaliana*, *Agrobacterium tumefaciens*, homologna rekombinácia, GUS

**Počet strán:** 37

**Jazyk:** Slovenský

## **Bibliographical identification**

**Author's first name and surname:** Tereza Dostálová

**Title:** Development of the population for analyses of homologous recombination frequencies in *Arabidopsis thaliana*

**Type of thesis:** Bachelor

**Department:** Department of Cell Biology and Genetics

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

**The year of presentation:** 2022

### **Abstract:**

The aim of the thesis was to transform *Arabidopsis thaliana* with constructs using *Agrobacterium tumefaciens* and select plants with T-DNA. As part of the work, heterozygous seeds of T1 generation were created and contain the constructs DU.GUS and IU.GUS and also seeds of T2 generation with DGU.US construct were created.

Another subject of this work was to determine whether the *dpcr3-2* gene is involved in homologous recombination. According to the theory, if the *dpcr3-2* gene participates in HR, the mutant should have fewer blue dots, which can be observed in young leaves of *Arabidopsis thaliana* after histochemical staining, than in WT. WT does not have a functional gene and therefore homologous recombination cannot take place as efficiently as in the mutant. By analyzing the frequency of homologous recombination, it was not possible to determine with certainty whether the *dpcr3-2* gene is involved in homologous recombination.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, *Agrobacterium tumefaciens*, Homologous recombination, GUS

**Number of pages:** 37

**Language:** Slovak

## **Pod'akovanie**

Na tomto mieste by som chcela poďakovať Mgr. Eve Dvořák Tomašíkovej za odborné vedenie, cenné rady a ochotu spolupracovať pri vypracovaní bakalárskej práce. Ďalej by som chcela poďakovať pracovníkom Ústavu experimentálnej botaniky v.v.i. AV ČR, ktorí v prípade potreby boli ochotní s čímkoľvek poradiť a vytvárali priaznivé pracovné prostredie



## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	CIEĽ PRÁCE .....	2
3	LITERÁRNY PREHĽAD.....	3
3.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	3
3.2	Arábkovka thalová a transformácia .....	5
3.2.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	6
3.2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> a transformácia .....	7
3.3	Poškodenie a opravné mechanizmy DNA .....	8
3.3.1	Homológna rekombinácia.....	9
3.3.2	Single strand annealing, SSA .....	11
3.3.3	Synthesis-dependent strand annealing, SDSA.....	12
3.4	$\beta$ -glukuronidáza .....	13
4	MATERIÁL A METÓDY .....	15
4.1	Biologický materiál.....	15
4.2	Použité chemikálie a roztoky .....	16
4.2.1	Použité chemikálie.....	16
4.2.2	Príprava a zloženie použitých roztokov .....	17
4.2.3	Použité primery .....	18
4.3	Použité prístroje a zariadenia .....	18
4.3.1	Zoznam použitých prístrojov a zariadení .....	18
4.3.2	Programy .....	19
4.4	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy .....	19
4.4.1	Výsev a sadenie rastlín .....	19
4.4.2	Transformácia baktérii freze-thaw metódov.....	19
4.4.3	Transformácia rastlín floral dip metódou .....	20
4.4.4	Sterilizácia semien pre nekontrolovateľný výsev .....	20
4.4.5	Selekcia T1 transformantov .....	20
4.4.6	Sterilizácia semien pre kontrolovaný výsev .....	21
4.4.7	Izolácia DNA.....	21
4.4.8	Polymerázová reťazová reakcia pre genotypovanie .....	22
4.4.9	Agarózová gélová elektroforéza .....	23
4.4.10	Kontrolovaný výsev semien T2 generácie .....	23

4.4.11	Kontrolovaný výsev semien línii RecE, RecB a mutantných línii dpcr3-2 RecE a dpcr3-2 RecB .....	23
4.4.12	Histochemické farbenie rastlín z línie RecE, RecB a mutantných línii dpcr3-2 RecE a dpcr3-2 RecB .....	23
4.4.13	Pozorovanie jednotlivých rastlín .....	23
5	VÝSLEDKY .....	24
5.1	Transformácia <i>A. tumefaciens</i> freeze-thaw metódou.....	24
5.2	Transformácia <i>A. thaliana</i> floral dip metódou a selekcia T1 transformantov .....	24
5.3	Segregačná analýza.....	24
5.4	Sledovanie frekvencie somatickej homológnej rekombinácie v líniiach RecE, RecB a mutantných líniiach dpcr3-2 RecE a dpcr3-2 RecB .....	26
5.4.1	PCR genotypovanie .....	26
5.4.2	Výsev semien a histochemické farbenie mladých rastlín .....	27
5.4.3	Analýza frekvencie homológnej rekombinácie .....	27
6	DISKUSIA .....	29
7	ZÁVER.....	30
8	LITERATÚRA.....	31

## ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

AP miesta	Abázicke miesta
ATB	Antibiotikum
Bp	Pár báz (z anglického „base pair“)
BER	Bázová excízna oprava (z anglického „base excision repair“)
BIR	Z anglického „ Break-Inducted Replication“
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSB	Dvojvláknový zlom (z anglického „double strand break“)
DSBR	Oprava dvojvláknového zlomu (z anglického „double strand break repair“)
EDTA	kyselina ehylendiamintetraoctová
Gent	Gentamycín
GUS	gén kódujúci $\beta$ -glukuronidázu
HR	Homológna rekombinácia
Hyg	Hygromycín
LOH	Strata heterozygotnosti
MMEJ	Mikrohomologicky sprostredkované spájanie koncov
MS medium	Murashige a Skoog médium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hydrogénfosforečnan sodný
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihydrogénfosforečnan sodný
NER	Nukleotidová excízna oprava
NHEJ	Nehomológne spájanie koncov
NOR	Jadierkový organizátor
ORF	Otvorený čítací rámec (
Rif	Rifampicín

RNA	Ribonukleová kyselina
SDSA	Z anglického „Synthesis-dependent strand annealing“
SHR	Somatická homológna rekombinácia
SSA	Z anglického „Single-strand annealing“
T-DNA	Transférová deoxyribonukleová kyselina
Ti	Z anlického „tumor inducing“
TOPOIII $\alpha$	TopoizomerázaIII $\alpha$
UV	Ultrafialové
YEB	Z anglického „Yeast Extract Beef Broth“

## ZOZNAM OBRÁZKOV

<b>Obrázok 1:</b> <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	3
<b>Obrázok 2:</b> Idiogram chromozómov <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	4
<b>Obrázok 3:</b> Dráhy homológnej rekombinácie pri oprave DSB.....	10
<b>Obrázok 4:</b> Systém na detekciu homológnej rekombinácie s využitím invertovaných repetícií GUS (beta gluc).....	14
<b>Obrázok 5:</b> T-DNA štruktúra HR reportérových konštruktov.....	15
<b>Obrázok 6:</b> Genotypovanie línií dpcr3-2 RecB.....	26
<b>Obrázok 7:</b> Graf priemerného počtu udalostí homológnej rekombinácie v rastlinných líniách RecE a dpcr3-2 RecE.....	28
<b>Obrázok 8:</b> Graf priemerného počtu udalostí homológnej rekombinácie v rastlinných líniách RecB a dpcr3-2 RecB.....	28

## ZOZNAM TABULIEK

<b>Tabuľka 1:</b> Zoznam primerov určených pre PCR genotypovanie.....	18
<b>Tabuľka 2:</b> Zloženie reakčnej zmesi pre polymerázovú reťazovú reakciu.....	22
<b>Tabuľka 3:</b> Program PCR reakcie.....	22
<b>Tabuľka 4:</b> Punnetov štvorec, kríženie dvoch heterozygotov.....	26
<b>Tabuľka 5:</b> Úspešnosť klíčenia jednotlivých replikátov.....	25
<b>Tabuľka 6:</b> Priemerný výskyt udalosti homológnej rekombinácie v líniach rastlín.....	27

# 1 ÚVOD

Chybami pri replikácii alebo faktormi prostredia ako sú UV žiarenie, gamma žiarenie, mutagény a pod. dochádza k 10 000 až 1 000 000 molekulárnych porúch na bunku za deň. (Lodish, H. *et al.*, 2004). Tieto molekulárne poruchy majú za následok poškodenie DNA, čo môže zmeniť alebo úplne zastaviť schopnosť bunky prepisovať gén, ktorý postihnutá DNA kóduje. V dôsledku toho sú procesy opráv DNA neustále aktívne.

Homológna rekombinácia je veľmi presná DNA opravná dráha a bolo vyvinutých niekoľko metód, ktoré umožňujú monitorovať početnosť opráv somatickou homológnou rekombináciou. Jednou z nich je využitie metódy využívajúcej plazmid, ktorý nesie neaktívny gén s vloženými invertovanými repetíciami pre  $\beta$ -glukuronidázu. Aktivita  $\beta$ -glukuronidázy sa obnoví po oprave DNA somatickou homológnou rekombináciou. Využitím modelového organizmu *Arabidopsis thaliana* a sledovaním frekvencie homológnej rekombinácie je možné určiť spôsob zapojenia sa záujmového génu do opráv poškodenej DNA.

Skutočnosť, že došlo k obnoveniu aktivity reportérového génu sa dá zistiť pomocou histochemického farbenia a následného pozorovania počtu výskytov úspešnej homológnej rekombinácie, ktorú môžeme monitorovať na základe množstva modrých bodiek v kľúčnych listoch mladých rastlín *Arabidopsis Thaliana*.

## 2 CIEĽ PRÁCE

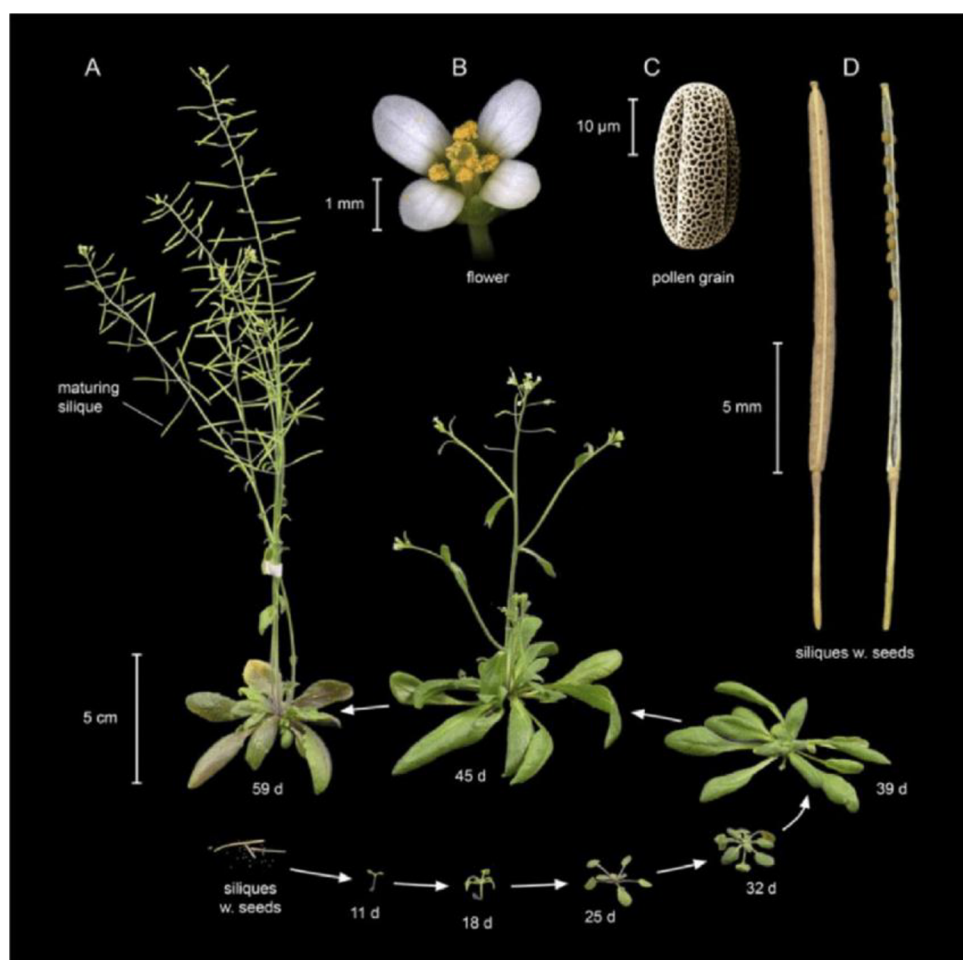
- Spracovanie literárnej rešerše na tému homológnej rekombinácie.
- Transformácia rastlín *Arabidopsis thaliana* existujúcimi konštruktmi pre analýzu frekvencie homológnej rekombinácie pomocou *Agrobacteria tumefaciens*.
- Selekcia transformantov na médiu s príslušnými antibiotikami.
- Zvládnutie in vitro techník používaných pri práci s *Arabidopsis thaliana* v sterilnom prostredí.



### 3 LITERÁRNY PREHLAD

#### 3.1 *Arabidopsis thaliana*

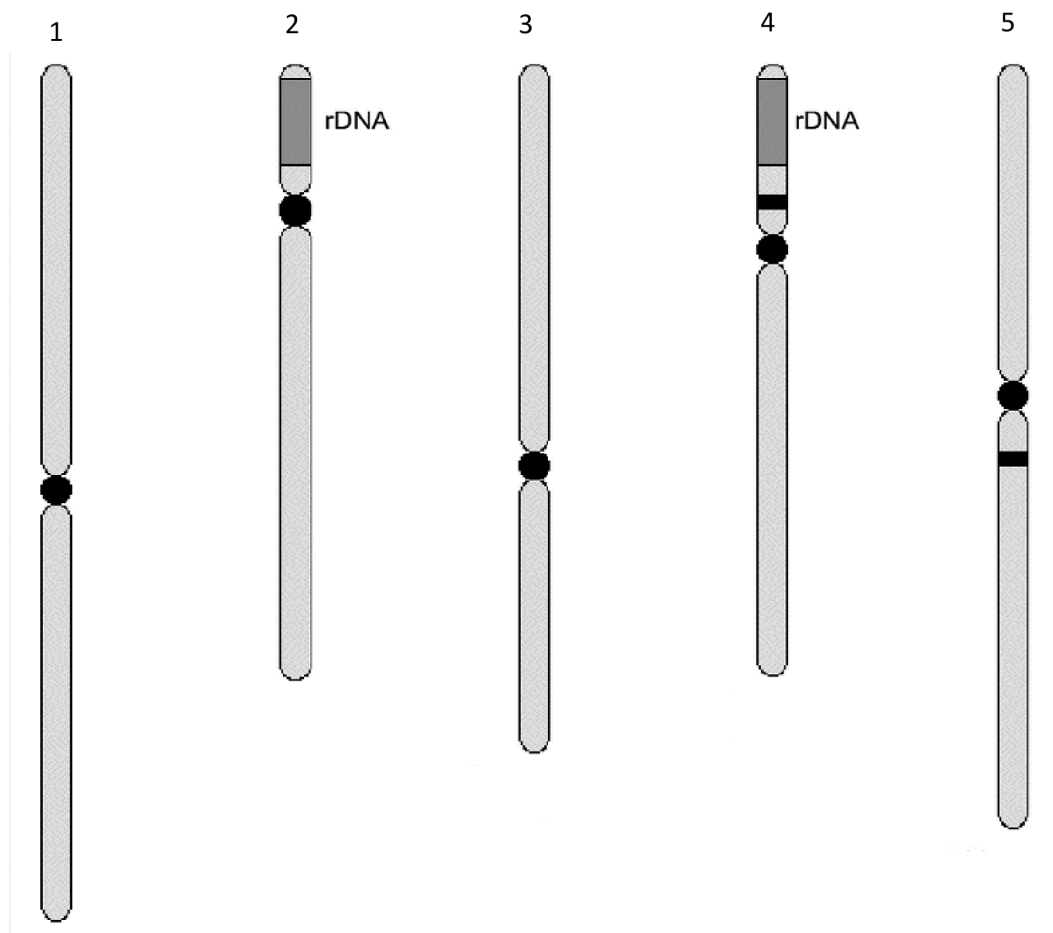
Arábkovka thalová (*Arabidopsis thaliana*) je malá kvitnúca rastlina rozšírená po celom svete. Patrí do čeľade kapustovitých (*Brassicaceae*), do ktorej patria aj bežne pestované druhy rastlín, ako je kapusta a reďkovka (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Cheng et al., 2017). V roku 2000 sa arábkovka thalová stala prvou rastlinou, ktorá mala kompletne osekvenovaný génom (Alonso et Ecker, 2006). Stavba arábkovky thalovej pozostáva z tenkého hlavného koreňa, prízemnej listovej ružice, priameho byľu a bielych korunných lístkov. V malom kvete sa nachádza jeden pestík obklopený 6 tyčinkami (Obrázok 1).



**Obrázok 1:** *Arabidopsis thaliana*

(A) *Arabidopsis thaliana* v rôznych štádiách životného cyklu, (B) kvet *A. thaliana*, (C) peľové zrnko, (D) zrelé šesule. (Krämer, 2015)

Jednou z jej výhodných vlastností je generačná doba, ktorá je pomerne krátka – kvitnutie nastáva asi po 6 týždňoch od vyklíčenia a semená dozrievajú najneskôr do 3 mesiacov (Page et Grossniklaus, 2002). Rozmnožuje sa samosprášením, čo umožňuje diferenciáciu a ustálenie drobných morfológicko-ekofyziologických odchýliek. Nie sú to však len biologické vlastnosti, ktoré arábkovku predurčujú pre výhodnú prácu v laboratóriu. Vhodným je práve jej génom, ktorý je jedným z najjednoduchších a najmenších, ktoré sú známe u vyšších rastlín. Druh *Arabidopsis thaliana* obsahuje päť párov chromozómov ( $2n = 10$ ) (Obrázok 2), ich celková fyzická veľkosť je spolu 125 Mb a bolo na nich objavených 27 655 génov kódujúcich proteíny (Cheng, Ch. *et al.* 2016).



**Obrázok 2: Idiogram chromozómov *Arabidopsis thaliana***

Päť chromozómov *Arabidopsis thaliana*. Osekvencované oblasti sú zobrazené svetlo šedou farbou. Tmavo sivou farbou sú označené oblasti, v ktorých je kódovaná rDNA. Heterochromatické oblasti a oblasti centroméry sú zobrazené čiernou farbou. (Johnson, X., *et al.* 2007)

Organizácia genómu je obzvlášť jednoduchá a priaznivá pre molekulárne genetické a genomické experimenty. Obsah vysoko opakujúcich sa sekvencií (10 %) a stredne opakujúcich sa sekvencií (10 %) je mimoriadne nízky. V genómoch iných rastlinných druhov môžu opakujúce sa prvky predstavovať až 95 % DNA. Opakujúce sa sekvencie môžu byť rozptýlené v genóme, ale to nie je prípad arábkovky, ktorá má tieto sekvencie zoskupené v špecializovaných miestach genómu. Jedno špecializované miesto je v oblasti centroméry, kde sa nachádzajú repetitívne pericentromérne sekvencie. Druhé miesto sa nachádza v oblasti nukleolárneho organizátora, ktorý kóduje ribozomálne RNA, a je lokalizované na konci chromozómov 2 a 4. Približne 80 % genómu je teda tvorených zriedkavo opakujúcich sa alebo jedinečnými sekvenciami. Hustota genómu je mimoriadne vysoká s génom vyskytujúcim sa v priemere každých 4,5 kb. Dĺžka génu je v priemere 1,9 kb a 79 % z génov je prerušených jedným alebo viacerými intrónmi. (Johnson, Bouchez, 2007).

### **3.2 Arábkovka thalová a transformácia**

Transformácia rastlín je proces genetickej manipulácie, ktorým sú cudzie gény zavedené do rastlinných buniek a stabilne integrované v rastlinných genómoch, transformované bunky sa regenerujú a vznikajú tak transgénné rastliny. Tradičné transformačné metódy najčastejšie pozostávajú z prípravy transformačne kompetentných rastlinných buniek alebo tkanív, vnesenie cudzích génov do rastlinných buniek najčastejšie pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens* alebo biolistickou metódou. Selekcie transformovaných buniek, ktoré stabilne inkorporovali cudzí gén a regenerácie transformovaných buniek do transgénnych rastlín. (Christou, P. 1996) Nakoľko táto metóda zahŕňa tkanivové kultúry a regeneráciu rastlín je tento prístup pracný a časovo náročný, okrem iného si vyžaduje aj relatívne drahé laboratórne vybavenie. Taktiež tento spôsob transformácie môže viesť k nežiadúcej modifikácii DNA počas procesu dediferenciácie a diferenciácie, ktorá je spôsobená stresom spôsobeným protokolom pre *in vitro* bunkové kultúry. (Labra, M., *et al.* 2004)

Spôsob transformácie rastlín, ktorý vylučuje použitie tkanivovej kultúry a regeneráciu rastlín, čím dôjde ku skráteniu času potrebného na produkciu transgénnych rastlín bol prvýkrát opísaný ako transformácia „*in planta*“ pred 35 rokmi. (Feldman, K.A., Marks, M.D. 1987) Feldmann a Marks sa vo svojej priekopníckej práci spoločne kultivovali klíčiace semená *Arabidopsis thaliana* a baktériu *Agrobacterium tumefaciens*, ktorá obsahovala neaktívny Ti plazmid a binárny vektor, takto sa im podarilo získať transgénné

línie, napriek tomu, že miera transformácie bola veľmi nízka. (Feldman, K.A., Marks, M.D. 1987)

O niekoľko rokov neskôr skupina Pelletier infiltrovala do kvitnúcej rastliny arábkovky thalovej *Agrobacterium*, čo veľmi zvýšilo efektivitu transformácie, tento spôsob transformácie sa nazýva „metóda vákuovej infiltrácie rastlín pomocou *Agrobacterium*“. (Bechtold, N., *et al.* 2003) Táto metóda zahŕňa vytrhnutie kvitnúcej rastliny arábkovky thalovej, vákuovú infiltráciu rastlín pomocou bunkovej suspenzie *Agrobacterium*, opätovné zasadenie, zber semien o niekoľko týždňov a skrining primárnych transformantov na médiu obsahujúcom selektívne činidlo (zvyčajne ATB alebo herbicíd). Tieto transformačné postupy boli neskôr zjednodušené a vylepšené. (Clough, S.J., Bent, A.F. 1998) Vo vylepšenej verzii je vynechané vytrhnutie a opätovné zasadenie infiltrovaných rastlín. Vákuovo sprostredkovaná infiltrácia súkvetí (Bechtold, N., *et al.* 2003) bola nahradená použitím povrchovo aktívnej látky (Silwet L-77), ktorá sa vyskytuje v zložení niektorých pesticídov, napomáha vstupu chemikálie do rastlinného pletiva. Všetky tieto úpravy zjednodušili počiatočný postup. Kvetné puky arábkovky boli jednoducho ponorené do suspenzie buniek *Agrobacterium*, ktorá obsahovala 5 % sacharózy a 0,01 – 0,05 % Silwet L-77, aby bola umožnená absorpcia agrobaktéria do samičích gamét. (Desfeux, C., *et al.* 2000, Bechtold, N., *et al.* 2003) Táto veľmi jednoduchá transformačná metóda sa označuje ako „floral dip“ metóda. (Clough, S.J., Bent, A.F. 1998)

Využitie transgénnych rastlín je veľmi široké. Jedným z nich je napríklad využitie pre štúdium antioxidantnej obrany (Allen, R.D., *et al.* 1997). Ďalším je bioremediácia pôd kontaminovaných stopovými prvkami. (Krämer, U., Chardonnens, A. 2001) V neposlednej rade sa dajú transgénne rastliny využiť aj na štúdium génovej expzie rastlín. (Willmitzer L. 1988)

### **3.2.1 *Agrobacterium tumefaciens***

*Agrobacterium tumefaciens* je pôdna fytopatogénna baktéria, ktorá je schopná preniesť segment svojho tumor-tvoriaceho (Ti) plazmidu, nazývaného aj T-DNA, do rastlín. Proteíny virulencie, ktoré sprostredkujú prenos sú taktiež lokalizované na Ti plazmide. Proteíny virulencie sú zapojené (priamo alebo prostredníctvom interakcie s hositeľskými faktormi) do vytvárania, premiestňovania, ochrany, jadrovej lokalizácie a pravdepodobne aj integrácie T-DNA do rastlinného genómu. (Hohn, B., 2001) T-DNA obsahuje eukaryotické expresné signály, ktorých expresia poskytuje enzýmy, ktoré dodávajú

jedinečné živiny pre baktériu a zapínajú mitotickú aktivitu transformovaných buniek. (Hohn, B., 2001)

### 3.2.2 *Agrobacterium tumefaciens* a transformácia

Vo voľne žijúcich agrobaktériách je väčšina génov virulencie, ktoré sú organizované v operónoch, neaktívne. Vnímanie signálov vychádzajúcich z poranených rastlinných buniek baktériami vedie k jedinečným akciám a reakciám na molekulárnej úrovni. Poranené rastlinné bunky vylučujú fenolické zlúčeniny a cukry, vnímanie týchto látok baktériou je interpretované ako blízkosť rastlinnej bunky, ktorá je pripravená na transformáciu. Po prichytení baktérie k rastlinnej bunke dôjde k udalostiam, ktoré zmenia príjem rastlinného signálu na transkripčnú aktiváciu všetkých génov virulencie. Na to aby došlo k úspešnej transformácii je potreba aby plazmid obsahoval počiatok replikácie, ktorý mu umožní replikáciu v hostiteľskom organizme, viacnásobné klonovacie miesto, kde sa nachádzajú viaceré miesta pre štiepenie restriktívnymi enzýmami a tak umožňujú vloženie transgénového inzertu.

Výsledkom úspešnej transformácie pomocou agrobaktérie je stabilná integrácia T-DNA do rastlinného genómu. Konečným cieľom patogénneho organizmu *A. tumefaciens* nie je len transformovať svojho hostiteľa, ale aj rozvrátiť jeho metabolizmus aby slúžil potrebám patogénu, a to tým, že hostiteľ začne produkovať zlúčeniny, ktoré k prežitiu potrebuje patogén. Dráha prenosu T-DNA z *Agrobacterium* do rastlinných buniek a jej konečná integrácia do genómu začína vytvorením zárezu v oblasti T-DNA Ti (nádor indukujúceho) plazmidu pomocou T-DNA endonukleázy, špecifickej pre hraničné oblasti, VirD2. (Yanofsky, M.F. *et al.* 1986, Stachel, S.E. *et al.* 1986, Jayaswal, R.K., *et al.* 1987, Veluthambi, K., *et al.* 1987, Veluthambi, K., *et al.* 1988) Zárezy sa objavujú medzi nukleotidmi 3 a 4 z 25 bp dlhej hraničnej sekvecie, ktorá lemujúceho T-DNA. (Yadav, N.S., *et al.* 1982, Wang, K., *et al.* 1984). Počas vytvárania zárezov v hraničných oblastiach T-DNA, VirD2 sa kovalentne viaže k 5' koncu T-DNA, čo vedie k vytvoreniu jednovláknovej formy T-DNA, T-vlákná, na svojom 3' konci obsahuje nukleotidy 4-25 z ľavej hranice, a na 5' konci obsahuje nukleotidy 1-3 z pravej hranice. (Herrera-Estrella, A. *et al.* 1988, Ward, E.R., *et al.* 1988, Young, C., *et al.* 1988, Durrenberger, F., *et al.* 1989, Howard, E.A., *et al.* 1989). VirD2 následne vedie T-vlákná cez vyhradený systém sekrécie proteínu typu IV (T4SS) a do rastlinnej bunky. (Tinland, B., *et al.* 1994, Yusibov, V.M., *et al.* 1994) V rámci rastliny môžu T-vlákná trpieť deléciami na 3' a/alebo 5' koncoch pred

alebo počas integrácie. Delécie obzvlášť prevládajú a sú rozšírenejšie na 3' konci ako na 5' konci, ktorý je chránený väzbou na proteín VirD2. (Durrenberger, F., *et al.* 1989)

Výsledky štúdií naznačujú, že proteíny spojené so štruktúrou a modifikáciou chromatinu sú dôležité pre integráciu T-DNA do genómov rastlín alebo kvasiniek a že v niektorých prípadoch, môže integrácia priamo ovplyvňovať expresiu ostatných génov potrebných pre integráciu T-DNA. Poloha integrácie T-DNA a chromatinová štruktúra tejto oblasti môže ovplyvniť expresiu transgénov kódovaných T-DNA. Variabilita v expresii transgénu ovplyvňuje štúdie funkcie génu a promotora. Je preto potrebné preskúmať veľké množstvo nezávislých transgénnych udalostí, aby mohli byť vyvedené závery. (Gelvin, S.B. 2021)

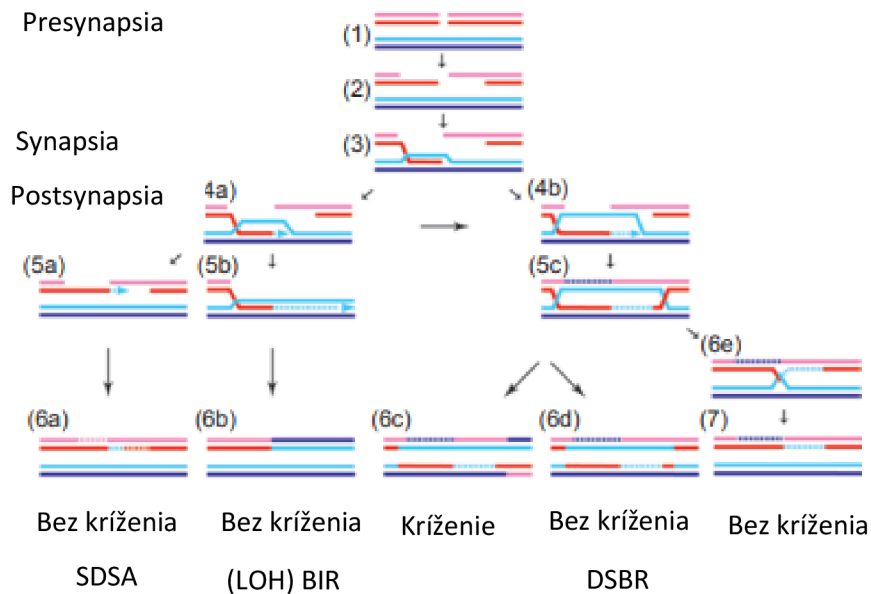
### **3.3 Poškodenie a opravné mechanizmy DNA**

Chybami pri replikácii alebo faktormi prostredia ako sú UV žiarenie, gamma žiarenie, mutagény a pod. dochádza k 10 000 až 1 000 000 molekulárnym poruchám na bunku za deň. (Lodish, H. *et al.*, 2004). Tieto molekulárne poruchy majú za následok poškodenie DNA, čo môže zmeniť alebo úplne zastaviť schopnosť bunky prepisovať gén, ktorý postihnutá DNA kóduje. V dôsledku toho sú procesy opráv DNA neustále aktívne. Rýchlosť opráv DNA závisí od mnohých faktorov ako je typ bunky, vek bunky a extracelulárne prostredie. Bunka, ktorá obsahuje už príliš veľa poškodení DNA a nie je schopná ich účinne opravovať môže vstúpiť do jedného z troch stavov. Buď dôjde do nezvratného štádia pokoja známeho ako senescencia alebo dôjde k programovanej bunkovej smrti – apoptóze, alebo nastane nekontrolované delenie buniek, ktoré vedie k tvorbe tumorov a rakoviny.

Bunky nemôžu fungovať pokiaľ poškodenie DNA naruší integritu a dostupnosť základných informácií v genóme. V závislosti od typu poškodenia sa vyvinuli rôzne opravné stratégie na obnovu stratených informácií. Bunky prednostne využívajú nemodifikované komplementárne vlákno DNA alebo sesterskú chromatídu ako templát na obnovenie pôvodnej informácie. Poškodenie DNA zmení priestorovú konfiguráciu molekuly DNA a tieto zmeny je bunka schopná detekovať. Akonáhle je poškodenie lokalizované, špecifické molekuly na opravu DNA sa viažu na miesto poškodenia alebo v jeho blízkosti, čím sa naviažu ďalšie molekuly a vytvorí sa komplex, ktorý umožní opravu. Existujú rôzne opravné mechanizmy v závislosti od typu poškodenia DNA a fázy bunkového cyklu. V tejto práci bude podrobnejšie rozobraná oprava pomocou homológnej rekombinácie.

### 3.3.1 Homológna rekombinácia

Homológna rekombinácia (HR) je jedným zo základných procesov života. Vďaka aktivite počas meiózy a v somatických bunkách má HR dvojakú funkciu. Vytvára nové kombinácie genetického materiálu v meióze čím vytvára genetickú variabilitu pomocou reciprokeho kríženia a výmeny DNA, čoho výsledkom sú náhodné kombinácie alel a znakov, ktoré podliehajú prirodzenému výberu, a preto prispievajú k evolúcii organizmu. V niektorých organizmoch zabezpečuje plodnosť. HR je taktiež potrebná pri opravách poškodenej DNA v somatických tkanivách, zároveň však HR musí byť striktne kontrolovaná pri repetitívnych sekvenciách aby nedochádzalo k nechceným prestavbám. HR udržuje integritu genómu v somatických bunkách. Somatická rekombinácia sa uplatňuje najmä pri opravách DSB. DSB patria medzi najnebezpečnejšie formy DNA poškodenia, už jeden neopravený DSB môže viesť k bunkovej smrti. (Bennett, C.B., *et al.* 1993) DSB sú spôsobené vonkajšími aj vnútornými faktormi. Príkladom vonkajšieho faktora je ionizujúce žiarenie a príkladom vnútorného je replikácia, ktorá prechádza cez zárez vo vlákne. V rastlinách a stavovcoch je väčšina DSB opravená nehomológnym spájaním koncov, tento proces priamo liguje prerušené konce bez potreby homológneho templátu, je však náchylný na chyby. (Moore, J.K., Haber, J.E, 1996) Homológna rekombinácia, na rozdiel od NHEJ, vyžaduje homológnu sekvenciu na vedenie opravy a tým umožňuje presnú opravu. (Schermann, D., *et al.* 2005) Dráh a produktov opráv DSB pomocou homológnej rekombinácie je niekoľko (Obrázok 3). Podrobne rozobrané budú dráhy SSA a SDSA v nasledujúcich kapitolách.



**Obrázok 3: Dráhy homológnej rekombinácie pri oprave DSB**

Homológna rekombinácia sa dá rozdeliť do troch etáp: presynapsia, synapsia a postsynapsia. Počas presynapsie sú konce DSB rozpoznané a upravené aby boli zakončené 3'-OH jednovláknovým koncom (krok 1-2). V synapsii dôjde k invázii vlákna DNA Rad51-ssDNA, ktorá generuje D-slučku (krok 3). po vytvorení D-slučky môže HR prebiehať tromi rôznymi cestami. Pri SDSA (kroky 4a – 5a – 6a), invazívne vlákno sa po syntéze DNA uvoľní a hybridizuje s druhým koncom, čo vedie k lokalizovanej konverzii bez kríženia. Tento proces môže zahŕňať viac kôl invázie, syntézy a uvoľnenia vlákna. Pri BIR (kroky 4a – 5b – 6b), je D-slučka zostavená do plnej replikačnej vidlice, ktorá kopíruje celú distálnu časť chromozómu, čo vedie k strate heterozygotnosti (LOH). Pri DSBR (kroky 4b – 5c – 6c-e – 7), sú oba konce DSB zapojené do opravy, buď samostatnou inváziou vlákna alebo zachytením druhého, čo vedie k tvorbe dvoch Hollidayových spojov. Tieto spoje môžu byť rozdelené pomocou rezolvázy na produkty bez kríženia alebo na produkty s krížením (kroky 6c a 6d). Spoje môžu byť prerušené aj mechanizmom zahŕňajúcim gén BLM, ktorý sprostredkúva migráciu vlákien, a TOPOIII $\alpha$ , ktorá katalyzuje rozdelenie hemikatenánu, tento proces vedie výhradne k tvorbe produktov bez kríženia (krok 7). (Li, X., Heyer, WD., 2008)



### 3.3.2 Single strand annealing, SSA

Single-strand annealing (SSA) je opravná dráha dvojlákových zlomov (DSB), ktorá využíva homológne opakovania na premostenie koncov DSB. SSA zahŕňa repetície, ktoré ohraničujú jeden DSB a spôsobuje preskupenie a delécie medzi repetíciami, a preto je relatívne mutagénna. (Bhargava, R., *et al.* 2016) Výskyt SSA bol zistený v bunkách cicavcov a v niektorých modelových organizmoch vrátane *Sacharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*. (Ivanov, E.L., *et al.* 1996, Do, A.T. *et al.* 2014, Orel, N., *et al.* 2003, Pontier, D.B., *et al.* 2009, Lin, F.L., *et al.* 1984)

Štúdiá z laboratória v Sternbergu z roku 1984 poskytla dôkazy o SSA pomocou substrátov DNA plazmidov nesúcich homológne opakovania, ktoré boli transfekované do myších buniek a navrhli model pre opis krokov tejto cesty. (Lin, F.L., *et al.* 1984) Tento model zahŕňa DSB medzi homológnymi opakovaniami, po ktorých nastáva DSB resekcia koncov, ktorá vytvorí na 3' ssDNA, ktorá odhaľuje lemujúce homológne sekvencie, ktoré sú spolu anelované, aby vytvorili medziprodukt. Tento medziprodukt je potom pripravovaný na ligáciu, čo zahŕňa endonukleolytické štiepenie nehomológnych 3' ssDNA chvostov a vyplnenie všetkých medzier polymerázou. Funkčnou analýzou niekoľkých faktorov sa zistilo, že DSB resekcia koncov, ktorá sa týka tvorby 3' ssDNA, je kľúčovým krokom SSA. SSA je závislé na CtIP (Munoz, M.C. *et al.* 2012, Bennardo, N., *et al.* 2008), čo je kľúčový faktor pre resekciu koncov, založený na meraniach tvorby ssDNA v miestach poškodenia DNA, ako aj faktor pre fyzikálnu analýzu miestne špecifických endonukleázou generovaných chromozomálnych DSB. (Satori, A.A., *et al.* 2007, Chen, L. *et al.*, 2008, Zhou, Y. *et al.* 2014) Taktiež boli objavené aj faktory, ktoré naopak inhibujú resekciu koncov, napríklad v dráhe reakcie na poškodenie DNA, ktorá zahŕňa H2AX, RNF168, 53BP1 a RIF1. (Munoz, M.C., *et al.* 2012, Zhou, Y., *et al.* 2014, Xie, A., *et al.* 2004, Escribano-Diaz, C., *et al.* 2013, Hakim, O., *et al.* 2012, Ochs, F., *et al.* 2016) Po resekcii koncov ďalšie kroky SSA zahŕňajú aneláciu lemujúcich opakovaní nasledovanú odstránením nehomológnych 3' ssDNA koncov, čo je sprostredkované pomocou RAD52 a ERCC1, resp. RAD52 je proteín viažuci DNA, ktorý môže sprostredkovať aneláciu substrátov ssDNA. (Mortensen, U.H., *et al.*, 2009, Symington, L.S. 2002, Rothenberg, E. *et al.*, 2008) ERCC1 sa spája s XPF za vzniku proteínového komplexu, ktorý je schopný nukleolyticky štiepiť 3' konce ssDNA. (Motyska, T.A., *et al.*, 2004) Okrem toho nukleázová aktivita komplexu ERCC1/XPF je posilnená RAD52. (Motyska, T.A., *et al.*, 2004).

SSA teda pozostáva z anelácie a odstránenia 3' ssDNA chvostov a vyplnenia všetkých medzier pomocou polymerázy aby boli vytvorené substráty pre ligáciu DNA a dokončenie SSA.

### 3.3.3 Synthesis-dependent strand annealing, SDSA

V roku 1994 sa zistilo, že štúdie o oprave DSB medzery u *Drosophila* sú nezlúčiteľné s modelom dvojitého Hollidayovho spojenia, čo viedlo k návrhu modelu, ktorý sa nazýva SDSA. (Nassif, N., *et al.* 1994) Štúdiom meiotickej rekombinácie v *S. cerevisiae* sa zistilo, že produkty ktoré nie sú krížené, sa objavujú skôr ako produkty dvojitého Hollidayovho spojenie alebo produkty s krížením, čo spochybnilo predchádzajúcu predstavu, že produkty s krížením aj bez kríženia sú vytvorené práve dvojitým Hollidayovým spojením a viedli k návrhu cesty SDSA, prostredníctvom ktorej sa vytvárali produkty bez kríženia. (Allers, T., *et al.* 2001)

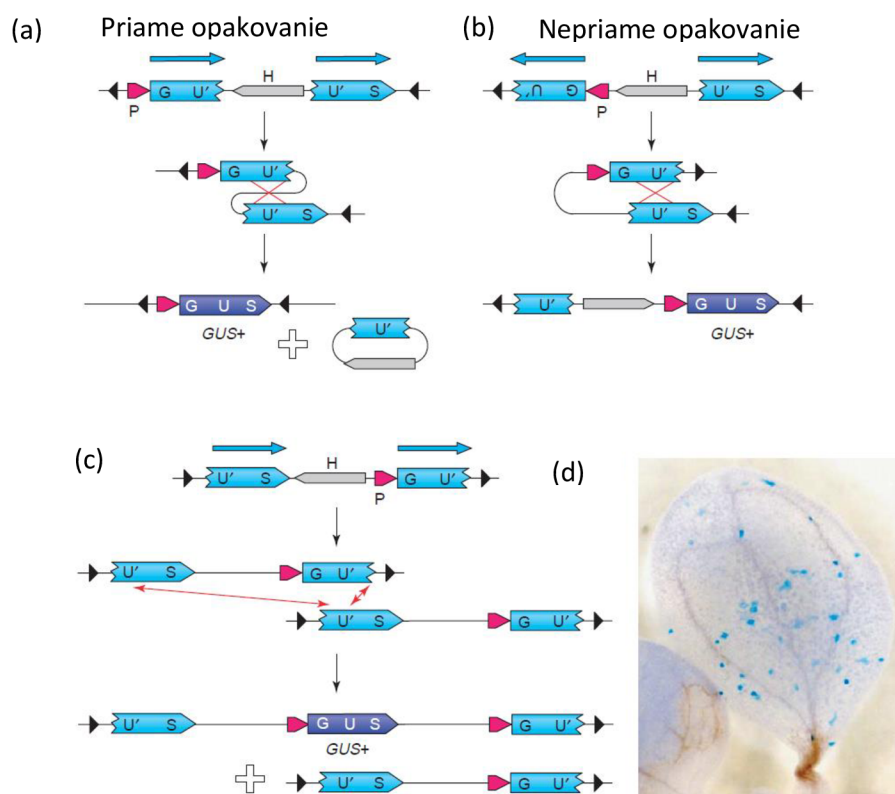
V modeli SDSA dochádza k oprave DSB bez vytvorenia Hollidayovho spojenia, takže dva procesy homológnej rekombinácie sú identické až do vytvorenia D-slučky. (McMahill, M.S., *et al.* 2007)) V kvasinkách je D-slučka vytvorená inváziou vlákna pomocou Rad51 a Rad52 (Dupaigne, P., *et al.* 2008), a potom naňho pôsobí DNA helikáza Srs2, ktorá zabráni tvorbe dvojitého Hollidayovho spojenia a aby mohla nastať dráha opravy pomocou SDSA. (Miura, T., *et al.* 2012) Napádajúce 3' vlákno je rozšírené pozdĺž recipientného homológneho DNA duplexu DNA polymerázov v smere 5' na 3', takže D-slučka sa fyzicky premiestňuje procesom nazývaným ako „bubble migration DNA synthesis“. (Formosa, T., *et al.* 1986) Výsledkom toho je tvorba jednoduchého Hollidayovho spojenia, ktoré kľže po duplex DNA v rovnakom smere v procese nazývanom migrácia vetvy, čím sa vytesňuje predĺžený reťazec z reťazca teploty. Totot premiestnené vlákno sa objaví a vytvorí 3' previs v pôvodnom dvojvláknovom prerušovanom duplexe, ktorý sa potom môže napojiť na opačný koniec pôvodného prelomenia pomocou komplementárneho párovania báz. Syntézou DNA sa vyplnia medzery, ktoré ostali po anelácii a predĺžia sa oba konce stále prítomného zlomu jednovláknovej DNA, pričom všetky ostávajúce medzery sú spojené, aby bola vytvorená rekombinantná Dna bez kríženia. (Helleday, T., *et al.* 2007)

SDSA je jedinečná v tom, že translokácia D-slučky vedie skôr ku konzervatívnej než k semikonzervatívnej replikácii, pretože prvé predĺžené vlákno je vytesnené zo svojho teplotového vlákna, pričom homológny duplex ostáva nedotknuté. Preto, aj keď SDSA produkuje produkty bez kríženia, pretože hraničné markery heteroduplexnej DNA sa

nevymieňajú, môže dôjsť ku konverzii génov, pri ktorej dochádza k nereciprokému genetickému prenosu medzi dvoma homógnymi sekvenciami. (Mahner, R.L., *et al.* 2011)

### 3.4 $\beta$ -glukuronidáza

Použitie fúzie medzi požadovaným génom a reportérovým génom s ľahko detekovateľným produktom ponúka množstvo výhod pre štúdium génovej expresie. Použitie sady testov na monitorovanie expresie rôznych génových kontrolných oblastí zjednodušuje analýzu a často zlepšuje citlivosť, s ktorou je možné vykonávať meranie aktivity génov. Mnohé gény vo vyšších organizmoch patria do génových rodín pozostávajúcich z niekoľkých príbuzných génov, ktorých expresia môže byť nezávisle kontrolovaná. (Cox, G.N., Hirsh, D., 1985) Zväčša je potreba študovať práve jedného člena takejto génovej rodiny bez rušivých vplyvov ostatných členov. Použitie *in vitro* generovaných génových fúzií a transformácie DNA umožňuje takúto analýzu. Najčastejšie používaným reportérovým génom je pravdepodobne *Escherichia coli lacZ* gén, ktorý kóduje  $\beta$ -glukuronidázu. (Lis, J.T., *et al.* 1984, Beckwith, J., *et al.* 1970)  $\beta$ -glukuronidáza má veľa vlastností vďaka, ktorým je hojne využívaná ako marker génovej fúzie. Gén a génový produkt sú dobre geneticky a biochemicky charakterizované (Obrázok 4). (Beckwith, J., *et al.* 1970)



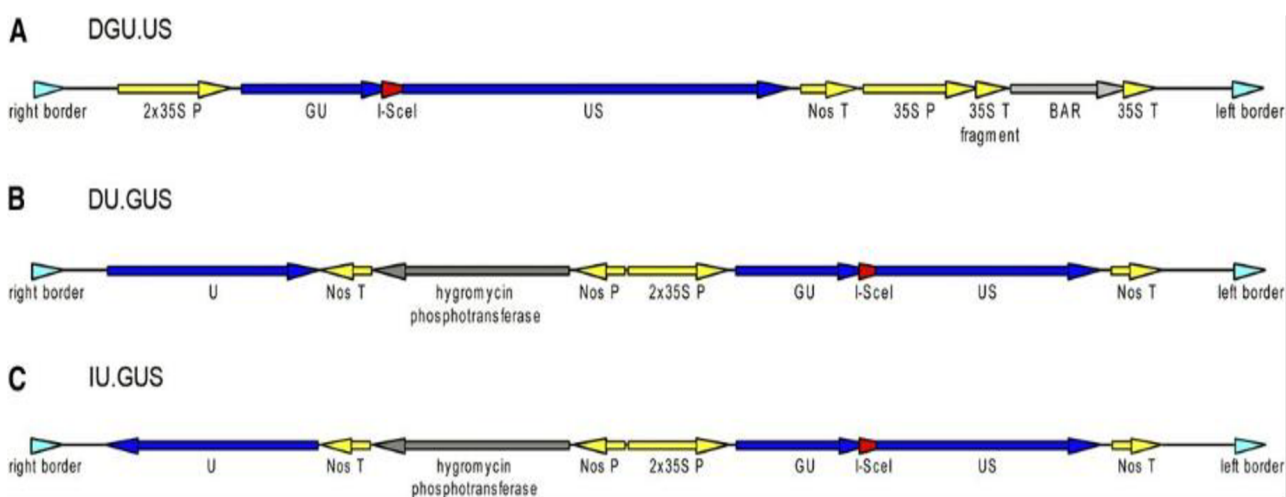
**Obrázok 4: Systém na detekciu homológnej rekombinácie s využitím invertovaných repetícií GUS (beta gluc)**

Intrachromozomálne reportérové konštrukty homológnej rekombinácie s priamymi a nepriamymi opakovaniami (a,b). Konštrukty pozostávajú z dvoch neaktívnych fragmentov (GU', U'S) génu  $\beta$ -glukuronidázy (GUS) zdieľajúceho identický úsek dlhý 618 bp (U'). Intramolekulárne udalosti HR medzi opakovaniami obnovujú funkčný gén (GUSC) s rôznymi molekulárnymi produktmi: Priame repetície (GU'-U'S) vedú k delícii sekvencie medzi dvoma repetíciami, čo pravdepodobne vedie ku krátkodobému vzniku nereplikatívnej kruhovej molekuly. HR medzi nepriamymi opakovaniami (U'G-U'S) vedie k inverzii a konzervácii sekvencie oddelujúcej repetície. Čierne trojuholníky predstavujú hranice T-DNA, P označuje CaMV vírusový promotor riadiaci expresiu GUS, H reprezentuje gén rezistencie voči hygromycínu. Reportérový konštrukt (c) vizualizuje intramolekulárne udalosti HR. Zistilo sa, že hlavnou cestou, ktorá vedie k obnove génu GUS, je génová konverzia, ale taktiež reciproká rekombinácia medzi sesterskými chromatidami alebo alelickými chromozómami. (Molinier, J. *et al.* 2004, Haubold, B. *et al.* 2002) *In planta* sú detekované rekombinačné udalosti, reportérové rastliny obsahujú stabilne integrovaný konštrukt HR, ako v (a). Histochemické farbenie GUS reportérových rastlín vizualizuje bunky, v ktorých bol gén GUS obnovený pomocou HR (d). (Schuerman, D. *et al.* 2005)

## 4 MATERIÁL A METÓDY

### 4.1 Biologický materiál

- Semená rastliny *Arabidopsis thaliana*, línia Col-0 wild type
- Semená rastliny *Arabidopsis thaliana*, línia WT RecE, RecB
- Semená rastliny *Arabidopsis thaliana* mutantné línie dpcr32 RecE, dpcr3-2 RecB
- Kompetentné baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, kmeň LBA4404
- Plazmid DGU.US (pCHN<sub>1</sub>DC<sub>4</sub>BI)
- Plazmid DU.GUS (pCH<sub>23</sub>I\*D)
- Plazmid IU.GUS (pCH<sub>23</sub>I\*I)



**Obrázok 5: T-DNA štruktúra HR reportérových konštruktov**

(A) Línia DGU.US obsahuje dva fragmenty GUS ORF s homológnyimi časťami (GU, US, označené modrou farbou) v priamej orientácii, ktoré sú oddelené rozpoznávacím miestom megaendonukleázy I-SceI (označené červenou). Expresia rekombinovaného kompletného génu GUS je riadená promotorom 2x35S a terminátorom Nos (označené žltou farbou). V rovnakej orientácii je ORF fosfinotricínacetyltransferázy (BAR, označené sivou farbou) ohraničený promotorom 35S a terminátorom 35D (označené žltou farbou). Na 3' konci promotora 35S sa nachádza fragment terminátora 35S (označený žltou farbou), ktorý neovplyvňuje selekciu BAR.

(B) V línii DU.GUS sú dva fragmenty GUS ORF bez vzájomnej homológie (GU, US označené modrou farbou) v priamej orientácii sú oddelené rozpoznávacím miestom megaendonukleázy I-SceI (označená červenou farbou). V rovnakom smere sa nachádza centrálny fragment GUS ORF homológny s GU aj s US (U, označené modrou farbou). Expresia rekombinovaného kompletného génu GUS je riadená promotorom 2x35S a terminátorom Nos (označené žltou farbou). Medzi fragmentmi U a GU je umiestnený ORF hygromycín fosfotransferázy (označený sivou farbou) pod kontrolou promotora Nos a terminátora Nos (označené žltou farbou)

(C) LÍNIA IU.GUS je konštruovaná podobne ako lÍNIA DU.GUS. Centrálny fragment GUS ORF (U, označené modrou farbou) je tu v obrátenej orientácii.

Všetky konštrukty sú ohraničené ľavou a pravou hraničnou sekvenciou (označená tyrkysovou farbou). (Holger, P., Hohn, B. 2012)

## **4.2 Použité chemikálie a roztoky**

### **4.2.1 Použité chemikálie**

- ½ MS médium
- Acetosyringon (MCE, kat.č. HY-W009884)
- Agar bacteriological (VWR Chemicalt, kat. č. 84609.0500)
- Agaróza (VWR Chemicals, kat. č. 0710-500G)
- Destilovaná voda
- Dihydrogénfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. S9638)
- DMSO (dimetyl sulfoxid) (Serva, kat.č. 39757)
- dimetylformamid (Salvus, kat. č. 000047)
- dNTPs (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R0191)
- DreamTaq™ Buffer (Thermo Fisher Scientific, kat. č. B65)
- DreamTaq™ DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EP0705)
- EDTA (kyselina ehylendiamintetraoctová) (Sigma-Aldrich, kat.č. E5134)
- Edwardsov pufer
- Etanol 70%
- Etanol 96% (Lach-ner, kat.č 20025-A96)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č.E8751-5G)

- Ferikyanid (Sigma-Aldrich, kat.č. 455989)
- Feroxyanid (Sigma-Aldrich kat. č. 244023)
- Gentamicín (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 15750060)
- Hydrogénfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. 1.06585)
- Hygromicín (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 10687010)
- Chlorman sodný (Merck, kat. č. 1056142500)
- Rifampicín (Sigma-Aldrich, kat. č. R0950000)
- Sacharóza p.a. (Lach-ner, kat.č. 40135-AP0)
- Silwet L-77 (PhytoTech LABS, kat. č. S7777)
- Triton X-100 (t-oktylfenoxypolyethoxyethanol) (Sigma-Aldrich, kat.č. 9002-93-1)
- Tween® 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. 9005-64-5)
- Voda
- X-Gluc (Sigma-Aldrich kat. č. B8049)
- YEB medium

#### **4.2.2 Príprava a zloženie použitých roztokov**

10% hypochlorid sodný s 0,01% Tween® 20: Zmiešať 7 ml zásobného roztoku NaClO s 3 ml destilovanej vody. Pomocou automatickej pipety s odstrihnutou špičkou pridať 10 µl detergentu Tween® 20.

½ Murashige a Skoog (MS) médium s 0,6% agarom: Zmiešať 22 g MS solí, 10 g sacharózy, 1 g MES a 6 g agaru. Doplňiť do objemu 1 l destilovanou vodou.

Roztok pre histochemické farbenie rastlín: Zmiešať 100 µl 10% Triton X-100, 200 µl 0,5mol·l<sup>-1</sup> EDTA, 400 µl 50mmol·l<sup>-1</sup> feroxyanidu, 400 µl 50mmol·l<sup>-1</sup> ferikyanidu, 780 µl 0,5 mol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 320 µl 0,5mol·l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mg X-Gluc a 400 µl dimetylformamidu.

Edwardov pufer (100 ml): Zmiešať 1mol.l<sup>-1</sup> Tris (pH 7,5 alebo 8) s 5 mol.l<sup>-1</sup> NaCl, 0,5mol.l<sup>-1</sup> EDTA, 10 % SDS a destilovanou vodou.

### 4.2.3 Použité primery

Primery použité pre PCR genotypovanie boli manuálne navrhnuté Mgr. Evou Dvořák Tomašíkovou, Ph.D. Zoznam použitých primerov je uvedený v Tabulke 1.

**Tabuľka 1: Zoznam primerov určených pre PCR genotypovanie**

Názov	Sekvencia 5' → 3'	Využitie v sete
ET0236	CAAGATTAGCTTTGCGTAGCCACT	Set 1
ET0237	CATTGCAATGGTTACAGGTCCAAG	Set 1, Set 2
ET0088	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT	Set 2
recB_F	TGCTGGTGAACACGTAAAGC	Set 4
recB_R	CAGTCGGATGGTTCGTTTCT	Set 4
GUS_F	ACCCGACGCGTCCGATCACCT	Set 3
GUS_R	ATTGAGTGCAGCCCGGCTAACG	Set 3

### 4.3 Použité prístroje a zariadenia

#### 4.3.1 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Analytické váhy (Sartorius)
- Digitálne predvážky Scout SC4010 (Ohaus)
- Flow box (Biohazard Thermo Scientific)
- Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
- Horizontálna elektroforéza MultiSUB Choice Trio so zdrojom napätia (Clever Scientific)
- Chladnička RK (Gorenje)
- Laboratórny digestor M 1800 (Merci)
- Laminárny box MSC 1.2 Advantage (Thermo Fisher Scientific)
- Magnetická miešačka VS-C7 (VWR)
- Miešačka vortex digit. (VWR)
- Mikrocentrifúga MicroStar 17R (VWR)
- Mikrovlnná rúra EMN (Zanussi)
- Rastová komora (Percival Scientific)
- Spektrometer (Amersham Biosciences)



- Stereomikroskop
- Termocykler T-gradient (Biometra)
- Termomixér thermal (VWR)
- Termostatická trepačka MaxQ 4000 (Thermo Fisher Scientific)
- Transiluminátor InGenius 3 (Syngene)
- Trepačka vortex VV3 (VWR)
- Vákuová pumpa
- Výrobník ľadu (Brema)
- Microsoft Excel (Microsoft)

#### 4.3.2 Programy

- GeneSnap verzia 7.12.06 (Syngene)
- Microsoft Excel (Microsoft)

#### 4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

##### 4.4.1 Výsev a sadenie rastlín

Do pôdy (značky Substat 1, Klasnabb-Deilmann) ošetrenej insekticídnym prostreidkom (značky SUBSTRAL CAREO), boli vysiate semená rastliny *Arabidopsis thaliana* Col-0, ktoré boli umiestnené do fytotronovej komory na 7 dní. Po siedmich dňoch bolo 40 rastlín presadených do jednotlivých kvetináčov so substrátom ošetreným insekticídom a opäť boli umiestnené do fytotronovej komory, do vytvorenia prízemnej ružice listov a prvých kvetov, cca. 6 týždňov.

##### 4.4.2 Transformácia baktérii freze-thaw metódov

Ku kompetentným baktériam *Agrobacterium Tumefaciens* kmeňa LBA4404 bol pridaný 1 µg plazmidu. Následne prebehla inkubácia pri teplote 37 °C po dobu 5 min. Po inkubácii bol do suspenzie pridaný 1 ml tekutého YEB média a následovala 4 hodinová inkubácia pri teplote 28 °C na termomixéry. Po dokončení inkubácie bola suspenzia centrifugovaná 30 s pri 13 000 rpm. Supernatant bol vyliaty a pelet bol resuspendovaný v 0,1 ml tekutého YEB média. Následne bola táto suspenzia rozotretá na misky s tuhým YEB média do ktorého bol pridaný Rif na koncentráciu 25µg/ml a Gent na koncentráciu 50 µg/ml. Takto pripravené misky boli inkubované pri 28 °C po dobu 3 dní. Po vyrastení kolónii baktérii na miskách z tuhým médiom, boli z každého druhu transformantu odobraté kolónie,

ktoré boli inokulované v malom množstve inkubačného média, ktoré pozostáva z tekutého YEB média a príslušných ATB v rovnakej koncentrácii, takto pripravená suspenzia bola inkubovaná na termostatickej trepačke pri teplote 28 °C cez noc. Nasledovala reinokulácia 1 ml čerstvej bakteriálnej kultúry do 100 ml tekutého inkubačného média a opäť prebehla inkubácia na termostatickej trepačke pri teplote 28 °C cez noc

#### **4.4.3 Transformácia rastlín floral dip metódou**

Po približne 3-4 týždňoch boli rastliny pripravené na transformáciu floral dip metódou. Z rastlín boli odstránené všetky šesule a vykvitnuté kvety. Suspenzia baktérii, ktorá sa inkubovala cez noc bola centrifugovaná pri 4 500 rpm na 20 min pri teplote 4 °C. Bol pripravený 5% roztok sacharózy v ktorom boli resuspendované baktérie na  $OD_{600} = 0,8$ . Po správnom nariadení bakteriálnej suspenzie bol do roztoku pridaný acetosyringón, rozpustený v DMSO, na koncentráciu  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , ďalej bol pridaný Silwet L-77 na konečnú koncentráciu 0,5%. Roztok bol premiešaný a do takto pripraveného roztoku boli ponorené rastlinné stonky a puky, približne na 2-3 s. Rastliny boli umiestnené na 24 h do tmy a na druhý deň boli odkryté a premiestnené do sklenníku, kde ostali až do dozretia šesúľ a vysušenia, aby bolo možné zozbierať semená, takto vznikla T0 generácia rastlín s inzertom.

#### **4.4.4 Sterilizácia semien pre nekontrolovateľný výsev**

Po dozretí šesúľ a zozbieraní semien, ktoré predstavujú T1 generáciu, je potrebné semená sterilizovať, aby bolo možné využiť ich na ďalšiu prácu. V sterilnom prostredí boli semená rozdelené do mikroskúmaviiek a bol k nim pridaný 70% roztok etanolu, semená boli uložené na trepačku po dobu 10 min. Po uplynutí času bol 70% etanol odstránený a nahradený 96% etanolom. V 96% etanole semená ostali po dobu 5 min taktiež za neustáleho trepania. Po uplynutí času bol etanol odstránený úplne a semená sa nechali vyschnúť v sterilnom prostredí.

#### **4.4.5 Selekcia T1 transformantov**

Vysterilizované semená boli nekontrolovane vysiate na Petriho misku s tuhým  $\frac{1}{2}$  MS médiom, do ktorého bol pridaný Hyg na koncentráciu 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pripravené misky boli uložené do rastovej komory na 7 dní. Po 7 dňoch nastala selekcja rezistentných rastlín, ktoré boli opäť presadené do ošetrenej pôdy a umiestnené do fytotronovej komory na 3-4 týždne. Po 3-4 týždňoch rast a dozrievanie šesúľ rastliny dokončili v sklenníku. Po dozretí a vysušení boli opäť zozbierané semená, ktoré predstavovali T2 generáciu.

#### **4.4.6 Sterilizácia semien pre kontrolovaný výsev**

Semená vyzbierané z T1 generácie, semená rastlín línie RecE a RecB a semená mutantných línií dpcr3-2 RecE a dpcr3-2 RecB, boli rozdelené do mikroskúmaviek a bol k nim v sterilnom prostredí pridaný 70% etanol, mikroskúmavky so semenami boli umiestnené na trepačku po dobu 5 min. Po uplynutí času bol odstránený etanol a k semenám bol pridaný 10% roztok hypochloridu sodného s 0,01% Tween®-20. V tomto roztoku semená ostali namočené 5 min. Po odstránení roztoku hypochloridu prebehli 3 kolá po 5 min, kedy semená boli v sterilnej vode. Po dokončení vymývania bol k semenám pridaný 0,1% roztok agarózy a boli premiestnené do chladničky na 2 dni.

#### **4.4.7 Izolácia DNA**

DNA bola izolovaná z mladých rastlín 6 vyselektovaných línií dpcr3-2 RecB, na overenie, či sa jedná o mutanty s kazetou na homológnu rekombináciu. Izolácia bola urobená podľa upraveného protokolu Edwardssa. Malé kúsky listov z jednotlivých rastlín sa vložili do 1,5ml mikroskúmaviek, ktoré boli naplnené sklenenými guľčkami. Po odobraní jednotlivých vzoriek boli mikroskúmavky uzavreté a zmrazené v tekutom dusíku. Následovala homogenizácia v Tissue Raptore. Po homogenizácii sa k vzorkám pridalo 100 µl Edwardsovho pufru. Skúmavky boli uzavreté a poriadne premiešané po dobu 15 s. Následovala centrifugácia pri 2250 x g po dobu 20 minút. Z každého vzorku bolo odobraných 80 µl supernatantu do mikroskúmavkového stripu. K vzorkám v stripe bolo pridaných 80 µl isopropanolu a boli premiešané na vortexe. Následovala centrifugácia pri 2250 x g na 10 min. Potom bol supernatant odstránený a k vzorkám bolo pridaných 80 µl 70% etanolu, opäť nasledovala centrifugácia pri 2250 x g po dobu 10 min. Supernatant bol odstránený a zvyšky etanolu v stripe sa nechali vysušiť na vzduchu približne 30 min. Po vysušení bolo pridaných 50 µl TE pufru, strip bol zvortexovaný a uložený do chladničky po pri teplote 4 °C cez noc.

#### 4.4.8 Polymerázová reťazová reakcia pre genotypovanie

Pre PCR amplifikáciu konkrétneho úseku DNA bola využitá DremTaq™Green DNA polymeráza (Thermo Fisher Scientific). Najprv bola pripravená reakčná zmes podľa počtu vzoriek, jednotlivé zložky a ich objemy sú uvedené v Tabulke 2, celkovo boli vytvorené 4 sety po 7 vzorkách, každý set obsahoval inú dvojicu primerov, použité primery sú zaznamenané v Tabulke 1. K rozpipetovanej reakčnej zmesi bola následne pridaná izolovaná DNA, výsledný objem reakcie bol 20 µl. Po prenesení jednotlivých vzoriek do termocyklieru bol nastavený program PCR reakcie podľa Tabulky 3.

**Tabuľka 2: Zloženie reakčnej zmesi pre polymerázovú reťazovú reakciu**

Zložka reakčnej zmesi	Koncentrácia zásobného roztoku	Konečná koncentrácia	Pipetovaný objem [µl] (celkový objem reakcie 20 µl)
DremTaq pufer	10×	1×	2
dNTP mix	2 mmol·l <sup>-1</sup>	0,2 mmol·l <sup>-1</sup>	2
Forward primer	10 µmol·l <sup>-1</sup>	0,5 µmol·l <sup>-1</sup>	1
Revers primer	10 µmol·l <sup>-1</sup>	0,5 µmol·l <sup>-1</sup>	1
DreamTaq™ DNA polymeráza	5 U·µl <sup>-1</sup>	0,5 U/reakcia	0,1
Destilovaná voda			12,9
Templátová DNA			1

**Tabuľka 3: Program PCR reakcie**

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklusov
Počiatočná denaturácia	95	3 min	1
Denaturácia	95	30 s	
Nasadanie primerov	Priemerná teplota tania primerov znižovaná o 5 °C	30 s	35
elongácia	72	1 min/kb	
Záverečná elongácia	72	10 min	1
Dokoknčenie reakcie	4	∞	

#### **4.4.9 Agarózová gélová elektroforéza**

K separácii PCR produktov bola použitá elektroforéza v 1% agarózovom géle s etidiom bromidom. Vedľa jednotlivých vzoriek bol do gélu napipetovaný aj GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ktorý slúžil k približnému stanoveniu veľkosti fragmentov PCR produktov. Elektroforetická separácia prebiehala po dobu 30 min pri napätí 100 V. Po jej skončení bol gél prenesený do UV transiluminátoru InGenius 3, pomocou ktorého bol pozorovaný výsledok.

#### **4.4.10 Kontrolovaný výsev semien T2 generácie**

Po dvojdnovej stratifikácii semien, boli semená kontrolovane vysadené na Petriho misku s tuhým  $\frac{1}{2}$  MS médiom, do ktorého bol pridaný Hyg na koncentráciu 50  $\mu\text{g/ml}$ . Takto bolo kontrolovane vysadených 100 semien rastlín T2 generácie.

#### **4.4.11 Kontrolovaný výsev semien línií RecE, RecB a mutantných línií dpcr3-2 RecE a dpcr3-2 RecB**

Na Petriho misky s tuhým  $\frac{1}{2}$  MS médiom boli kontrolovane vysiatých 50 semien línií RecE, RecB a mutantných línií dpcr3-2 RecE a dpcr3-2 RecB v troch replikátoch. Každý z troch replikátov bol umiestnený na inú polohu v rastovej komore na 10 dní.

#### **4.4.12 Histochemické farbenie rastlín z línie RecE, RecB a mutantných línií dpcr3-2 RecE a dpcr3-2 RecB**

Po 10 dňoch boli rastliny z Petriho misiek, ktoré boli umiestnené v rastovej komore odobrané do plastových vialiek, kde k nim bol pridaný roztok pre histochemické farbenie a zložené nylonové pletivo. Na takto pripravené vialky s rastlinami bolo použité vákuum na 5-10 min. Po uvoľnení vákua boli rastliny v uzavretých vialkách premiestnené do inkubátora pri teplote 37 °C cez noc. Na druhý deň boli opakovane vzorky premyté 70% etanolom, dokiaľ sa zcela neodstránil chlorofyl a listy boli priehľadné.

#### **4.4.13 Pozorovanie jednotlivých rastlín**

Po histochemickom farbení rastlín GUS, bolo 30 rastlín od každej línie a z každého replikátu pozorovaných pod stereomikroskopom. Do programu Microsoft Excel boli zaznamenané počty výskytu somatickej HR, ktoré sa prejavujú ako modré body na kľíchnych listoch.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Transformácia *A. tumefaciens* freeze-thaw metódou

Baktérie *A.tumefaciens* boli transformované plazmidmi. Boli pripravené Petriho misky s tuhým YEB médiom, do ktorého boli pridané antibiotiká Rif a Gent. Na takto pripravené misky boli natreté baktérie, ktoré boli transformované freeze-thaw metódou. Po narastení kolónii, boli odobraté 2 kolónie z každej misky a preočkované do malého množstva tekutého YEB média s ATB ako pri tuhom médiu. V prvom kole transformácie sa podarilo natransformovať baktérie iba plazmidom DGU.US. Transformácia bola ešte 2krát zopakovaná pre plazmidy DU.GUS a IU.GUS, neúspešne. Po neúspešných kolách transformácie boli pripravené čerstvé baktérie *A.tumefaciens* kmeňa LB4404 a transformácia bola zopakovaná, tento raz už úspešne.

### 5.2 Transformácia *A. thaliana* floral dip metódou a selekcia T1 transformantov

Po namnožení boli baktérie reinokulované v 100 ml tekutého YEB média s rovnakými ATB. Namnožené baktérie boli ďalej použité na transformáciu 10 rastlín floral dip metódou. Takto vznikli rastliny T0 generácie, ktorých semená predstavovali T1 generáciu a obsahovali jeden inzert, boli teda heterozygotné. Kvôli niekoľkým nevydareným kolám transformácie baktérii plazmidmi DU.GUS a IU.GUS, boli rastliny s týmito inzertmi vytvorené neskôr. Kvôli časovej náročnosti ďalších krokov sa so semenami s týmito inzertmi, ktoré predstavovali T1 generáciu ďalej nepracovalo, na ďalšiu prácu boli použité semená T1 generácie s inzertom DGU.US, ktoré sa podarilo vytvoriť skôr. Tieto semená, ktoré boli následne sterilizované na nekontrolovateľný výsev a podrobené selekcii na tuhom ½ MS médiu s pridaným Hyg. Dvom semenám sa podarilo na médiu vyklíčiť a boli presadené do Petriho misky s čistým ½ MS médiom a uložené do rastovej komory na 7 dní. Po 7 dňoch boli mladé rastliny presadené do pôdy oštrenej insekticídmi a umiestnené do fytotronovej komory.

### 5.3 Segregačná analýza

Po dozretí a vysušení šesť rastlín T1 generácie boli zozbierané semená (T2 generácia), ktoré boli sterilizované na kontrolovaný výsev na tuhom ½ MS médiu s pridaným Hyg. Kontrolovaným výsevom bolo vysiatych 100 semien T2 generácie *A.thaliana* s inzertom DGU.US v troch replikátoch. Semená T2 generácie vznikli samosprašením heterozygotných rastlín T1 generácie a obsahovali dominantný marker.

Preto by podľa 2. Mendelovho zákona, ktorý hovorí o segregácii alel a ich kombináciach v druhej generácii krížencov malo vyklíčiť 75 % semien. Dominantní homozygoti by mali tvoriť 25 % a heterozygoti 50 %. Prehľad kríženia heterozygotných jedincov je v Tabulke 4. Po 7 dňoch od kontrolovaného výsevu, boli spočítané jednotlivé semená, ktoré vyklíčili. Priemerná úspešnosť klíčenia bola 74 %. Počet semien, ktorým sa podarilo vyklíčiť v jednotlivých replikátoch je zobrazený v Tabulke 5. Semená, ktoré neboli použité pre kontrolu obsahu inzertu v genóme boli uskladnené a budú použité v ďalšom výskume.

**Tabuľka 4: Punnettov štvorec, kríženie dvoch heterozygotov**

	<b>A</b>	<b>a</b>
<b>A</b>	<b>AA</b>	<b>Aa</b>
<b>a</b>	<b>Aa</b>	<b>aa</b>

**Tabuľka 5: Úspešnosť klíčenia jednotlivých replikátov**

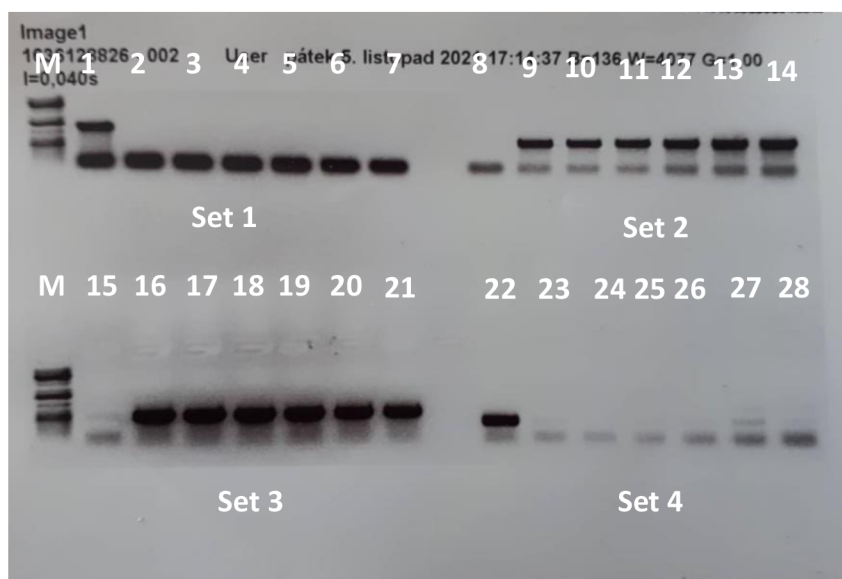
	<b>Počet vysiatých semien</b>	<b>Počet vyklíčených semien</b>	<b>Úspešnosť klíčenia</b>
<b>Replikát 1</b>	100	73	73 %
<b>Replikát 2</b>	100	74	74 %
<b>Replikát 3</b>	100	75	75 %
<b>Priemer</b>	100	74	74 %

## 5.4 Sledovanie frekvencie somatickej homológnej rekombinácie v líniah RecE, RecB a mutantných líniah dpcr3-2 RecE a dpcr3-2 RecB

Kvôli časovej náročnosti tvorby ďalšej generácie rastlín a selekcii heterozygotov s inzertmi DGU.US nebola analýza frekvencie homológnej rekombinácie robená na rastlinách vytvorených v rámci tejto práce. Analýza frekvencie homológnej rekombinácie bola preto urobená na už dostupných líniah od Mgr. Evy Dvořák Tomašíkovej, Ph.D.

### 5.4.1 PCR genotypovanie

Predtým ako mohla byť pozorovaná frekvencia homológnej rekombinácie v dostupných líniah bolo potrebné PCR genotypovaním overiť, či vyselektované mutantné línie dpcr3-2 RecB obsahujú kazetu pre homológnu rekombináciu. Na základe výsledkov horizontálnej elektroforézy, bolo zistené, že mutantné línie dpcr3-2 RecB obsahujú kazetu na homológnu rekombináciu a môžu byť ďalej použité pre sledovanie frekvencie SHJ, viď Obrázok 6.



**Obrázok 6: Genotypovanie línii dpcr3-2 RecB**

M – marker molekulovej hmotnosti, Set 1 - primery ET0236 a ET0237 (prítomnosť WT alely), 1. stĺpec WT kontrola, 2. – 7. stĺpec mutantné línie. Set 2 – primery ET0237 a ET0088 (prítomnosť mutantnej alely), 8. stĺpec WT kontrola, 9. – 10. stĺpec mutantné línie. Set 3 – primery GUS\_F a GUS\_R (prítomnosť GUS inzertu), 15. stĺpec WT kontrola, 16. – 21. stĺpec mutantné línie, Set 4 – primery recB\_F a recB\_R (prítomnosť recB alely), 22. stĺpec WT kontrola, 23. – 28. stĺpec mutantné línie.



#### 5.4.2. Výsev semien a histochemické farbenie mladých rastlín

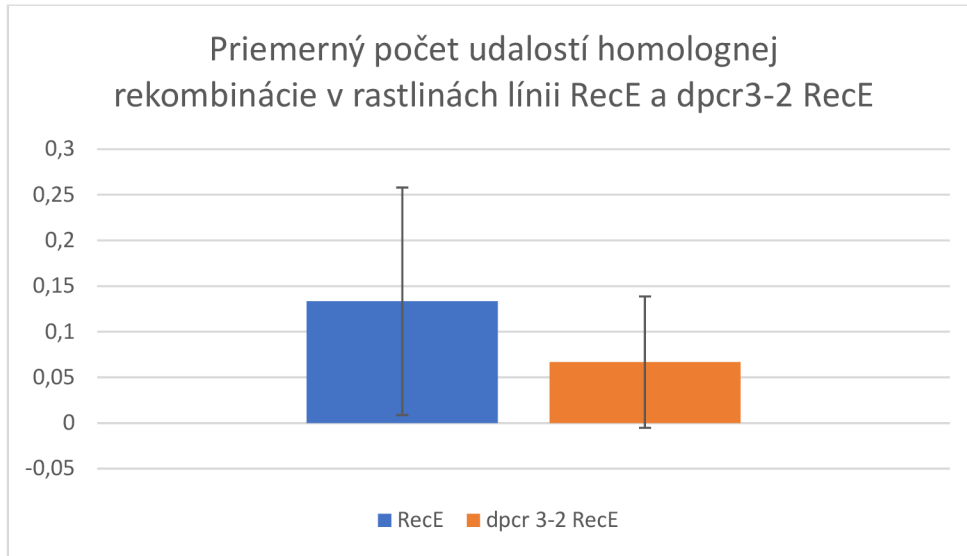
Semená rastlín dostupných línií boli sterilizované metódou pre kontrolovaný výsev a následne vysiate v troch replikátoch na Petriho misky s ½ MS médiom, na každú misku bolo vysiatych 50 semien. Misky boli uložené Po 10 dňoch v rastovej komore boli rastliny z misiek odobrané do vialiek a podrobené histochemickému farbeniu GUS. Po dokončení farbenia a vymytí chlorofylu bolo pomocou stereomikroskopu pozorovaných 30 rastlín zo všetkých línií a všetkých 3 replikátov, celkovo tak 360 rastlín.

#### 5.4.3 Analýza frekvencie homológnej rekombinácie

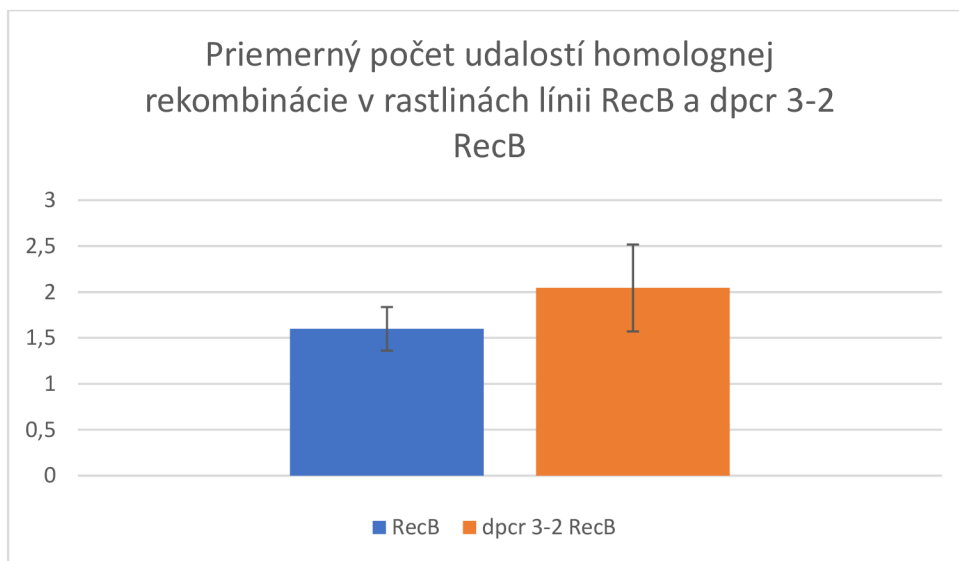
V rastlinách línie RecE a dpcr3-2 RecE prebieha SHJ prostredníctvom SSA dráhy a v rastlinách línií RecB a dpcr3-2 RecB pomocou SDSA dráhy. V mladých listoch boli spočítané jednotlivé modré body, body zobrazovali jednotlivé bunky, v ktorých došlo k oprave, inzertu nesúceho génu pre  $\beta$  - glukuronidázu, pomocou SHR a pomocou programu Microsoft Excel bol vypočítaný priemerný výskyt udalosti homológnej rekombinácie vo všetkých líniách (Tabuľka 6). Podľa teórie pokiaľ sa gén dpcr3-2 podieľa na HR, tak by sa v mutantovi malo vyskytovať menej bodiek ako vo WT (WT nemá funkčný gén a teda HR nemôže prebiehať rovnako efektívne ako v mutantovi). Na základe výsledkov analýzy frekvencie homológnej rekombinácie bolo zistené, že vo WT línií RecE sa udalosti homológnej rekombinácie vyskytujú 2krát častejšie ako v mutantnej línií dpcr3-2 RecE (Obrázok 6). V mutantnej línií dpcr3-2 RecB sa udalosti homológnej rekombinácie vyskytujú 1,2krát častejšie ako vo WT línií RecB (Obrázok 7).

**Tabuľka 6: Priemerný výskyt udalosti homológnej rekombinácie v líniách rastlín**

Línia	Priemerný počet udalostí HR v jednotlivých replikátoch			Celkový priemer	Smerodatná odchýlka
	Replikát 1	Replikát 2	Replikát 3		
RecE	0,100	0,000	0,300	0,133	0,125
Dpcr3-2 RecE	0,167	0,033	0	0,067	0,072
RecB	1,933	1,400	1,464	1,599	0,238
Dpcr3-2 RecB	1,600	2,700	1,833	2,044	0,4732



**Obrázok 7: Graf priemerného počtu udalostí homologej rekombinácie v rastlinných líniach RecE a dpcr3-2 RecE**



**Obrázok 8: Graf priemerného počtu udalostí homologej rekombinácie v rastlinných líniach RecB a dpcr3-2 RecB**

## 6 DISKUSIA

Pôvodným plánom tejto práce bolo vytvorenie transgénnych rastlín s inzertmi DGU.US, DU.GUS a IU.GUS a selekcia dominantných homozygotov, avšak kvôli časovej náročnosti projektu a opakovaným zlyháním pri snahe o transformáciu baktérii *A.tumefaciens* plazmidmi DU.GUS a IU.GUS sa nám podarilo vytvoriť semená T2 generácie len pre plazmid DGU.US, u ktorých sme segregáčnou analýzou potvrdili, že vznikli samosprášením heterozygotných rastlín T1 generácie a jedná sa teda o segregujúcu generáciu. Po úspešnom transformovaní baktérii aj ďalšími dvoma plazmidmi, ktoré sa podarilo až po príprave čerstvých kompetentných baktérii, sme transformovali ďalšie rastliny *A.thaliana*, z týchto rastlín sme po dozretí a usušení šesť vyrobili semená T1 generácie. Semená T1 generácie aj semená segregujúcej T2 generácie, ktoré sa podarilo vytvoriť boli uchované a budú predmetom ďalšieho štúdia.

Po overení prítomnosti kazety pre homológnu rekombináciu, vo vopred vyselektovaných mutantných líniah *dpcr3-2 RecB*, pomocou PCR genotypovania sme analyzovali frekvenciu homológnej rekombinácie vo WT líniah *RecE* a *RecB* a v mutantných líniah *dpcr3-2 RecE* a *dpcr3-2 RecB*. U rastlín línie *dpcr3-2 RecE* a *RecE* homológna rekombinácia prebieha SSA dráhou. U rastlín línie *dpcr3-2 RecB* a *RecB* homológna rekombinácia prebieha dráhou SDSA. Pôvodne sa predpokladalo, že pokiaľ sa gén *dpcr3-2* podieľa na HR bude na mutantných líniah pozorovateľný menší počet modrých bodiek ako na líniah WT, pretože vo WT rastlinách nie je funkčný gén a teda by homológna rekombinácia nemohla prebiehať rovnako efektívne ako v mutantných líniah. Pre línie *RecE* a *dpcr3-2 RecE* tento predpoklad platí avšak pre línie *RecB* a *dpcr3-2 RecB* sa nepotvrdil, preto sa nedá s určitosťou tvrdiť, že gén *dpcr3-2* sa nejakým spôsobom podieľa na homológnej rekombinácii.

## 7 ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bolo transformovať *Arabidopsis thaliana* konštruktmi DGU.US, DU.GUS a IU.GUS pomocou *Agrobacterium tumefaciens* a vyselektovať rastliny s T-DNA. V rámci práce boli vytvorené heterozygotné semená T1 generácie, ktoré obsahujú konštrukty DU.GUS a IU.GUS a semená T2 generácie s konštruktom DGU.US, u ktorých sa podarilo segregáčnou analýzou dokázať, že sa jedná o segregujúcu populáciu nakoľko priemerná úspešnosť vyklíčenia semien bola 74 %, čo odpovedá druhému Mendelovmu zákonu o krížení dvoch heterozygotov.

V línii dpcr3-2 RecB bola genotypovaním potvrdená prítomnosť kazety pre homológnu rekombináciu. Následne bola v líniiach RecE, RecB, dpcr3-2 RecE a dpcr3-2 RecB analyzovaná frekvencia homológnej rekombinácie. V línii RecE bol priemerný výskyt udalostí homológnej rekombinácie 0,133, v línii dpcr3-2 RecE bol priemerný výskyt udalostí homológnej rekombinácie 0,067. V línii RecB bol priemerný výskyt udalostí homológnej rekombinácie 1,599 a v línii dpcr3-2 RecB 2,044. Na základe týchto výsledkov nebolo možné určiť či sa gén dpcr3-2 podieľa na homológnej rekombinácii.

## 8 LITERATURA

Allen, R.D., Webb R.P., Schake, Sh. A., Use of Transgenic Plants to Study Antioxidant Defenses, *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 23, Issue 3, 1997, p. 473-479.

Allers T, Lichten M (July 2001). "Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis". *Cell*. **106** (1): 47–57.

Alonso, J.M., Ecker, J.R. (2006). Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in Arabidopsis. *Nature Reviews Genetics* 7, 524–536.

Bennett, C.B. et al. (1993) Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5613–5617

Bechtold, N., Jolivet, S., Voisin, R. & Pelletier, G. The endosperm and the embryo of Arabidopsis thaliana are independently transformed through infiltration by Agrobacterium tumefaciens. *Transgenic Res.* 12, 509–517 (2003).

Beckwith, J.R., Zipser, D., eds. (1970) *The Lactose Operon* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Bennardo, N. et al. (2008) Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet.* 4.

Bhargava, R., Onyango, D. O., & Stark, J. M. (2016). *Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance. Trends in Genetics*, 32(9), 566–575.

Clough, S.J. & Bent, A.F. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16, 735–743 (1998).

Cox, G.N., Hirsh, D. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5., 363-372.

Desfeux, C., Clough, S.J. & Bent, A.F. Female reproductive tissues are the primary target of Agrobacterium-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method. *Plant Physiol.* 123, 895–904 (2000).

Do, A.T. et al. (2014) Double-strand break repair assays determine pathway choice and structure of gene conversion events in Drosophila melanogaster. *G3 (Bethesda)* 4, 425–432

Dupaigne P, Le Breton C, Fabre F, Gangloff S, Le Cam E, Veaute X (February 2008). "The Srs2 helicase activity is stimulated by Rad51 filaments on dsDNA: implications for crossover incidence during mitotic recombination". *Molecular Cell*. **29** (2): 243–54.

Durrenberger F., Cramer A., Hohn B., Koukolikova-Nicola Z. Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86:9154–9158.

Escribano-Diaz, C. et al. (2013) A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol. Cell* 49, 872–883

Formosa T, Alberts BM (December 1986). "DNA synthesis dependent on genetic recombination: characterization of a reaction catalyzed by purified bacteriophage T4 proteins". *Cell*. **47** (5): 793–806.

Gelvin SB. Plant DNA Repair and *Agrobacterium* T-DNA Integration. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 6;22(16):8458.

Hakim, O. et al. (2012) DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes. *Nature* 484, 69–74

Haubold, B. et al. (2002) Recombination and gene conversion in a 170-kb genomic region of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 161, 1269–1278

Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP (July 2007). "DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment". *DNA Repair*. **6** (7): 923–35.

Herrera-Estrella A., Chen Z.-M., Van Montagu M., Wang K. VirD proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are required for the formation of a covalent DNA-protein complex at the 5' terminus of T-strand molecules. *EMBO J*. 1988;7:4055–4062.

Hohn B., Transfer of Genetic Information from *Agrobacterium tumefaciens* to Plants, *Encyclopedia of Genetics*, Academic Press, 2001, Pages 1984-1986, ISBN 9780122270802.

Holger Puchta, Barbara Hohn, In Planta Somatic Homologous Recombination Assay Revisited: A Successful and Versatile, but Delicate Tool, *The Plant Cell*, Volume 24, Issue 11, November 2012, Pages 4324–4331

Howard E.A., Winsor B.A., De Vos G., Zambryski P. Activation of the T-DNA transfer process in *Agrobacterium* results in the generation of a T-strand-protein complex: Tight association of VirD2 with the 5' ends of T-strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86:4017–4021.

- Cheng, C.-Y., Krishnakumar, V., Chan, A. P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., & Town, C. D. (2017). Araport11: a complete reannotation of the Arabidopsis thaliana reference genome. *The Plant Journal*, 89(4), 789–804.
- Christou, P. Transformation technology. *Trends Plant Sci.* 1, 423–431 (1996).
- Ivanov, E.L. et al. (1996) Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142, 693–704
- Jasinski, Sophie & Chardon, Fabien & Nesi, Nathalie & Lécureuil, Alain & Guerche, Philippe. (2018). Improving seed oil and protein content in Brassicaceae: Some new genetic insights from *Arabidopsis thaliana*. OCL. 25. 10.1051/ocl/2018047.
- Jayaswal R.K., Veluthambi K., Gelvin S.B., Slightom J.L. Double-stranded cleavage of T-DNA and generation of single-stranded T-DNA molecules in *Escherichia coli* by a *virD*-encoded border-specific endonuclease from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 1987;169:5035–5045.
- Jefferson R.A., Burgess S.M., Hirsh, D.  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8447-8451 (1986)
- Johnson, Xenie & Bouchez, David. (2007). The Model Species, *Arabidopsis thaliana*. 10.1201/b10760-23.
- Kilby, N.J., Leyser, H.M., and Furner, I.J. (1992). Promoter methylation and progressive transgene inactivation in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 20: 103–112.
- Krämer, U., Chardonnens, A. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 661–672 (2001)
- Labra, M. et al. Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. *Theor. Appl. Genet.* 109, 1512–1518 (2004).
- Li, X., Heyer, WD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18, 99–113 (2008).
- Lin, F.L. et al. (1984) Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol. Cell Biol.* 4, 1020–1034

Lin, X. et al. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402, 761–768 (1999).

Lis, J.T., Simon, J.A., Sutton, C.a. (1984) *Cell* 35, 403-410.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J (2004). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed.). New York: WH Freeman. p. 963.

Maher RL, Branagan AM, Morrical SW (October 2011). "Coordination of DNA replication and recombination activities in the maintenance of genome stability". *Journal of Cellular Biochemistry*. **112** (10): 2672–82.

Mayer, K. et al. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402, 769–777 (1999).

McMahill MS, Sham CW, Bishop DK (November 2007). "Synthesis-dependent strand annealing in meiosis". *PLOS Biology*. **5** (11): e299.

Meinke, D.W. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282, 662–682.

Miura T, Yamana Y, Usui T, Ogawa HI, Yamamoto MT, Kusano K (May 2012). "Homologous recombination via synthesis-dependent strand annealing in yeast requires the Irc20 and Srs2 DNA helicases". *Genetics*. **191** (1): 65–78.

Molinier, J. et al. (2004) Interchromatid and interhomolog recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16, 342–352

Moore, J.K., Haber, J.E.. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 16 (5): 2164-2173 (1996).

Mortensen, U.H. et al. (2009) Rad52. *Curr. Biol* 19, R676–R677

Motycka, T.A. et al. (2004) Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. *J. Biol. Chem.* 279, 13634–13639

Munoz, M.C. et al. (2012) RING finger nuclear factor RNF168 is important for defects in homologous recombination caused by loss of the breast cancer susceptibility factor BRCA1. *J. Biol. Chem.* 287, 40618–40628

Nassif N, Penney J, Pal S, Engels WR, Gloor GB (March 1994). "Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair". *Molecular and Cellular Biology*. **14** (3): 1613–25.



- Ochs, F. et al. (2016) 53BP1 fosters fidelity of homology-directed DNA repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Published online June 27, 2016.
- Orel, N. et al. (2003) Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *Plant J.* 35, 604–612
- Page, D.R., Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* 3, 124–136.
- Pontier, D.B. and Tijsterman, M. (2009) A robust network of double-strand break repair pathways governs genome integrity during *C. elegans* development. *Curr. Biol.* 19, 1384–1388
- Rothenberg, E. et al. (2008) Human Rad52-mediated homology search and annealing occurs by continuous interactions between overlapping nucleoprotein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20274–20279
- Salanoubat, M. *et al.* Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 820– 822 (2000).
- Schuermann D, Molinier J, Fritsch O, Hohn B. The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends Genet.* 2005 Mar;21(3):172-81.
- Stachel S.E., Timmerman B., Zambryski P. Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature.* 1986;322:706–712.
- Symington, L.S. (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 630–670
- Tabata, S. *et al.* Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 820– 822 (2000)
- Theologis, A. *et al.* Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 816– 820 (2000).
- Tinland B., Hohn B., Puchta H. *Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91:8000–8004.

- Ülker, B., Rahman, M., Hommelsheim, C.M., Berson, T., Thomas, S., Chandrasekar, B., Olcay, A.C., Berendzen, K.W., and Frantzeskakis, L. (2012). Re-evaluation of the reliability and usefulness of the somatic homologous recombination reporter lines. *Plant Cell* 24: 4314 - 4323.
- Veluthambi K., Jayaswal R.K., Gelvin S.B. Virulence genes A, G, and D mediate the double-stranded border cleavage of T-DNA from the *Agrobacterium* Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987
- Veluthambi K., Ream W., Gelvin S.B. Virulence genes, borders, and overdrive generate single-stranded T-DNA molecules from the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 1988;170:1523–1532. doi: 10.1128/jb.170.4.1523-1532.1988.
- Wang K., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Zambryski P. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell*. 1984;38:455–462.
- Ward E.R., Barnes W.M. VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. *Science*. 1988;242:927–930.
- Willmitzer, L. The use of transgenic plants to study plant gene expression, *Trends in Genetics*, Vol. 4, Issue 1, 1988, p. 13-18, ISSN 0168-9525.
- Xie, A. et al. (2004) Control of sister chromatid recombination by histone H2AX. *Mol. Cell* 16, 1017–1025
- Xiuren, Z., Rossana H., Shih-Shun, L., Qi-Wen, N., Nam-Hai, Ch. (2006). *Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method.* , 1(2), 641–646.
- Yadav N.S., Van der Leyden J., Bennett D.R., Barnes W.M., Chilton M.-D. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982;79:6322–6326.
- Yanofsky M.F., Porter S.G., Young C., Albright L.M., Gordon M.P., Nester E.W. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell*. 1986;47:471–477.
- Young C., Nester E.W. Association of the VirD2 protein with the 5' end of T strands in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 1988;170:3367–3374.

Yusibov V.M., Steck T.R., Gupta V., Gelvin S.B. Association of single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994;91:2994–2998.

Zhou, Y. et al. (2014) Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic Acids Res.* 42, e19