

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Autoreferát dizertační práce

Studium mechanismů rekombinace DNA u rostlin

Study of the DNA recombination mechanisms in plants

Mgr. Jaroslav Kozák

Praha 2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Laboratoř biologie pylu, UEB, AV ČR, v. v. i.

Autor: Mgr. Jaroslav Kozák

Školitel: RNDr. Karel J. Angelis, CSc.

S dizertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty
Univerzity Karlovy v Praze

Obsah/Content

Abstrakt	4
Cíle práce.....	5
Úvod	6
Seznam metod	11
Diskuze	12
Závěr.....	16
Abstract.....	17
Aims of the thesis	18
Introduction	19
List of methods	24
Discussion.....	25
Conclusion	30
Seznam literatury/Literature	31
Životopis.....	36
Curriculum Vitae	37
Publikace/Publications	38

Abstrakt

Dvouvláknový zlom DNA (DSB) je nebezpečný typ poškození DNA, ale zároveň také slouží ke kontrolovanému zvyšování genetické variability. Za hlavní dráhy opravy DSB se považují homologní rekombinace (HR), využívající homologní sekvence, a nehomologní spojování konců DNA (C-NHEJ). Dva rostlinné modely *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) a mech *Physcomitrella patens* (*Physcomitrella*) se liší strategií opravy DSB. *Arabidopsis* dává přednost C-NHEJ a *Physcomitrella* zase HR. Tyto modelové rostliny jsou porovnány na základě měření kinetiky opravy DSB a jednovláknových zlomů DNA (SSB) kometovým testem.

U obou rostlinných druhů je poločas první rychlé fáze opravy DSB kolem 5 minut. I když je C-NHEJ považována za hlavní dráhu opravy DSB u *Arabidopsis*, rychlá oprava není závislá na jejích faktorech AtKu80 a AtLIG4, což poukazuje na existenci efektivních záložních nehomologních drah (A-NHEJ). U *Physcomitrella* dominuje rychlá oprava DSB v mitoticky aktivních buňkách a také není závislá na PpLIG4. Naopak PpLIG4 se překvapivě účastní opravy alkylačního poškození DNA.

Esenciální ligázou rychlé opravy DSB u *Arabidopsis* je replikační AtLIG1, která je také zodpovědná za opravu alkylačního poškození DNA, a tak představuje funkční homolog LIG3. Rychlá oprava DSB je také zcela závislá na AtSMC6b, který patří do skupiny proteinů udržujících strukturu chromozomů (SMC). Menší defekt v opravě DSB je pozorován u mutantů podjednotky kohezinů AtRAD21 a AtGMI1, nově identifikovaného člena skupiny proteinů, které minimálně obsahují SMC dimerizační doménu (SMCHD). Role AtSMC6b, AtRAD21 a AtGMI1 v opravě DSB spočívá v organizaci sesterských chromatid.

Komplex proteinů MRE11, RAD50 a NBS1 (MRN), je jeden z klíčových senzorů a mediátorů opravy DSB. U *Physcomitrella* se na většině funkcí MRN komplexu podílí pouze PpMRE11 a PpRAD50. Extrémní citlivost *ppmre11* a *pprad50* vůči indukci DSB sice poukazuje na značný defekt v opravě, ten však nesouvisí s rychlostí jejich opravy, ale naopak s kumulací mutací, zejména delecí. V tomto ohledu je důležitý především PpRAD50, neboť v jeho nepřítomnosti se mutabilita zvyšuje až o dva řády.

Cíle práce

- Porovnání kinetiky opravy DSB a vymezení role C-NHEJ u *Arabidopsis* a *Physcomitrella*.
- Charakterizace úlohy MRN komplexu v opravě DSB u *Physcomitrella*.
- Vymezení role AtLIG1 a PpLIG4 v opravě DSB a SSB.
- Prozkoumání vlivu defektu v AtSMC6b, AtRAD21 a SMCHD proteinu AtGMI1 na opravu DSB.

Úvod

Řízený vznik DSB a jeho následná rekombinantní oprava je součástí řady přirozených procesů. DSB se zároveň považuje za velmi nebezpečný typ poškození DNA, neboť neopravený zlom může vést k reorganizaci genomu, ztrátě DNA při dělení buňky, nebo indukci buněčné smrti (Bennett et al. 1996). U rostlin se nachází homology většiny proteinů, které se u savců podílejí na opravě DSB. V tomto ohledu se rostliny podobají savcům víc než kvasinky (Shrivastav et al. 2008).

Z hlediska opravy DNA představují rostliny velmi zajímavý systém. Přisedlý způsob života, využívání nejsilnější biologické redoxní reakce - fotolýzy vody, tvorba rostlinného těla dělením několika apikálních buněk, u některých druhů dlouhověkost a schopnost vegetativního množení poukazují na existenci efektivních drah opravy DNA. Atraktivní je také viabilita jednotlivých, ale i vícečetných mutantů řady opravných proteinů, které jsou často letální u jiných organismů (Charbonnel et al. 2011).

Indukce DSB

Řada nežádoucích DSB vzniká kolapsem replikační vidličky a při selhání funkce topoizomeráz. Mitochondrie a chloroplasty jsou významným zdrojem radikálů (Triantaphylidès a Havaux 2009), jejichž reakce s DNA může vést až k DSB (Kuzminov 2001). V případě rostlin je také důležitým zdrojem DSB proces vysychání a opětovné hydratace (Kranner et al. 2010).

K indukci DSB se nejčastěji používá ionizující záření (IR), které při průchodu prostředím buňky ionizuje molekuly vody a produkuje radikály. Další možnost je přírodní antikancerogenní antibiotikum Bleomycin (BLM), které napodobuje účinek IR. BLM chelátuje kovy a po interkalaci do DNA a reakci s kyslíkem produkuje superoxid poškozující DNA. Redukcí se komplex opět aktivuje a následuje další štěpení za vzniku DSB (Strekowski et al. 1988). Aktivita BLM se vlivem interkalace omezuje především na DNA, a proto ve srovnání s IR produkuje méně SSB na 1 DSB (Povirk et al. 1977).

Měření opravy DSB

Opravu DSB je možné monitorovat mnoha způsoby, které však vždy pokrývají jen část zkoumané problematiky. Jednotlivé metody umožňují sledovat fyzické spojení DNA, kovalentní modifikace opravných proteinů, jejich časoprostorové rozdělení,

či změny sekvence v místě opravy. Jednou z běžných přímých metod detekce fragmentace genomu je také kometový test, který je založen na elektroforéze jednotlivých buněk ukotvených v agarózovém gelu. Vzniklý útvar připomíná kometu, ve které množství DNA v ohonu komety (%T DNA) koreluje s mírou poškození DNA v dané buňce (Ostling a Johanson 1984). Nejběžnější je neutrální, anebo alkalické provedení kometového testu, která umožňují detekci DSB, anebo SSB. Případná inkubace vzorků s reparačními endonukleázami umožňuje měření poškození DNA, které se samo o sobě neprojevuje jako zlom, například alkylované a oxidované báze DNA (Angelis et al. 1999; Collins et al. 1997; Angelis et al. 2000).

Cytotoxické testy slouží nejen k identifikaci citlivých mutantů opravných proteinů, ale vypovídají také o kvalitě opravy DSB. Tu je možné dále studovat určením mutability selekčního genu a sekvenací vzniklých mutací. U *Physcomitrella* umožňuje haploidní genom mutační analýzu genu pro adenin fosforibosyltransferázu (*APT*), jehož inaktivací mutant získává schopnost růstu na médiu obsahujícím jinak toxický 2-fluoroadenin (Trouiller et al. 2007). Mutační analýza *APT* tak v kombinaci s kometovým testem umožňuje měření kvality i kinetiky opravy DSB (Kamisugi et al. 2012; Holá et al. 2013).

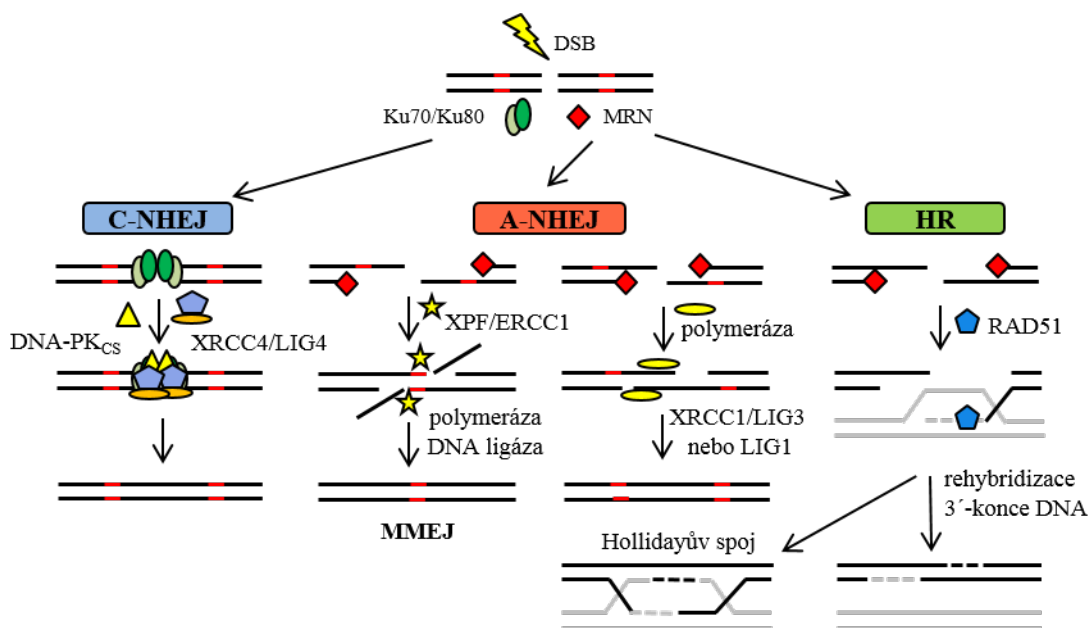
Dráhy opravy DSB

Za hlavní mechanismy rekombinace se u rostlin považují HR a C-NHEJ. Nutnost existence homologní sekvence omezuje HR především do S a G₂ fáze buněčného cyklu. Naopak C-NHEJ probíhá po celý buněčný cyklus, neboť spojuje konce DNA nezávisle na homologii. Během C-NHEJ může docházet k resekci nebo prodloužení konců DNA, a tak je C-NHEJ více náchylná ke změně sekvence DNA než HR (Pfeiffer et al. 2004). C-NHEJ je realizována komplexy Ku70/Ku80 a XRCC4/LIG4 (West et al. 2002; van Attikum et al. 2003). Pro HR je klíčový RAD51 (obr. 1) (Abe et al. 2005).

Preferování HR, nebo C-NHEJ se do jisté míry odráží ve schopnosti cíleně integrovat cizorodou DNA. U *Arabidopsis*, zástupce vyšších rostlin, se za hlavní dráhu opravy DSB považuje C-NHEJ, neboť úroveň cílené integrace je až tisíc krát nižší ve srovnání s nahodilou (Britt a May 2003; Puchta 2005). Naopak snadné cílení genů u člena nižších rostlin mechu *Physcomitrella* svědčí o preferenci HR (Kamisugi et al. 2005).

U *Arabidopsis* jsou mutanti C-NHEJ citliví vůči IR, ale na druhou stranu u nich stále probíhá fúze telomer, ligace linearizovaných plastidů a integrace cizorodé DNA

(Friesner a Britt 2003; Heacock et al. 2004; Gallego et al. 2003). Tato C-NHEJ nezávislá oprava DSB není mediována HR (Charbonnel et al. 2011; Decottignies 2013) a citlivý fenotyp *atku80* a *atlig4* svědčí o jisté mutabilitě A-NHEJ (West et al. 2002; van Attikum et al. 2003). U *Arabidopsis* se nachází více A-NHEJ drah. Jedna z nich vykazuje závislost na mikrohomologiích v místě opravy DSB (MMEJ) a podílí se na ní AtXPF/AtERCC1 komplex a AtMRE11 (Charbonnel et al. 2011; Heacock et al. 2004). Další odlišné A-NHEJ se účastní AtXRCC1 (obr. 1) (Charbonnel et al. 2010; Charbonnel et al. 2011).



Obrázek 1.: Základní dráhy opravy DSB.

Viabilita mutantů, ale i vícečetných mutantů opravných proteinů, umožňuje určit hierarchii opravy DSB u *Arabidopsis*. U mitotických buněk vede defekt ve všech dosud známých drahách opravy DSB, tedy C-NHEJ, HR, A-NHEJ a MMEJ k extrémně citlivému fenotypu vůči DSB, avšak oprava DSB u tohoto mutantu stále probíhá. Tato zbytková ligační aktivita se projevuje zvýšenou frekvencí fúzí telomer (Charbonnel et al. 2011).

Rostlinné DNA ligázy

Rostliny se od jiných eukaryot liší v zastoupení DNA ligáz, přičemž v jejich genomu se nenachází homolog LIG3, která je u savců součástí báze excizní opravy (BER) a A-NHEJ (Cappelli et al. 1997; Simsek et al. 2011). U *Arabidopsis* se defekt v AtLIG4 projevuje zvýšenou expresí dvou zbývajících DNA ligáz, replikační AtLIG1 a pro rostliny specifické AtLIG6 (Furukawa et al. 2015). Kumulativní efekt deficience

v AtLIG4 a AtLIG6 poukazuje na minimálně dvě odlišné dráhy opravy DSB v klíčovém semenech, avšak viabilita dvojitého mutanta AtLIG4/AtLIG6 naznačuje, že AtLIG1 musí být sama o sobě dostatečně efektivní v odstraňování zlomů DNA (Waterworth et al. 2010).

MRN komplex v opravě DSB

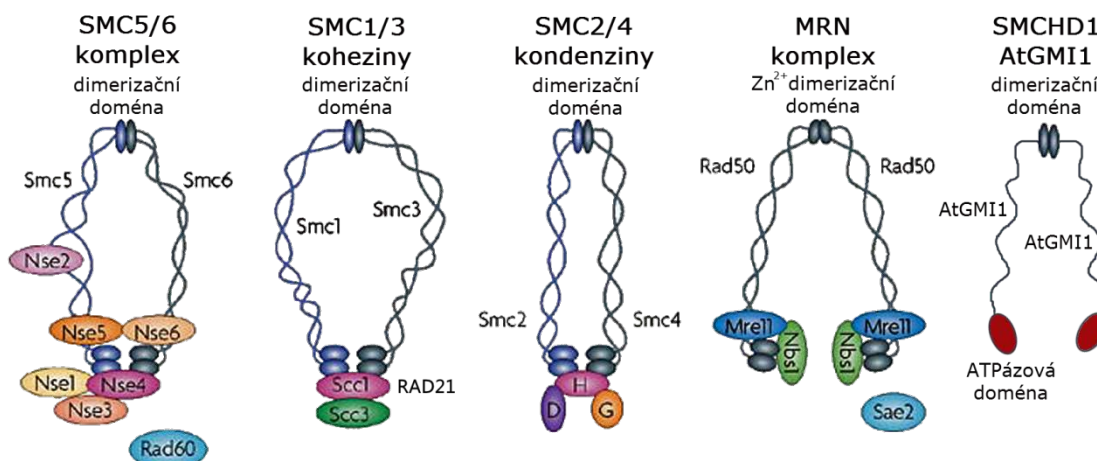
MRN komplex se u savců považuje za jeden z klíčových senzorů DSB, jenž aktivuje kinázy ATM a ATR, které spouští buněčnou odpověď. Pro aktivaci ATM je důležitá interakce s NBS1 (Girard et al. 2002; Lamarche et al. 2010). MRN komplex je významnou součástí opravy DSB vystupující v HR, A-NHEJ a C-NHEJ (De Jager et al. 2001; Lamarche et al. 2010). Struktura MRN komplexu je podmíněna RAD50, který umožňuje překlenout DSB (obr. 2) (De Jager et al. 2001). Nukleázová aktivita MRE11 může vést k resekci konců DSB a produkci 3'-jednovláknových úseků DNA (Jazayeri et al. 2006). Tyto konce DNA jsou substrátem pro HR, ale i A-NHEJ. A-NHEJ je však spojována s translokacemi (Simsek a Jasin 2010), a proto je vhodné nukleázovou aktivitu MRE11 omezit především do S a G₂ fáze buněčného cyklu. U *Arabidopsis* je MRN komplex esenciální pro meiózu a *atrad50* a *atmre11* jsou citliví k indukci poškození DNA (Gallego et al. 2001; Bundock a Hooykaas 2002). Stejně jako u savců i u rostlin je MRN komplex nezbytný pro aktivaci ATM a ATR (Amiard et al. 2010).

***Arabidopsis* AtSMC6b, AtRAD21 a AtGMI1 v opravě DSB**

Procesy spojené s opravou DSB probíhají na úrovni chromatinu. Na organizaci chromozomů se podílejí také SMC proteiny, které tvoří základ tří typů komplexů (obr. 2). Komplex SMC1/3 odpovídá za kohezi sesterských chromatid, SMC2/4 komplex se podílí na kondenzaci chromosomů během buněčného dělení a SMC5/6 komplex se účastní HR. Nutnost stabilizace sesterských chromatid se u savčích mutantů SMC1/3 a SMC5/6 komplexů projevuje defektem v HR (Potts et al. 2006). Důležitost SMC proteinů podporuje fakt, že se evolučně objevily dříve než histony (Nasmyth a Haering 2005).

SMC proteiny obsahují na N- a C-konci motivy pro vazbu ATP, které jsou oddělené spojníkem, jenž má uprostřed dimerizační doménu. Sbalení SMC proteinu vede k tvorbě ATPázy (Haering et al. 2002). Základní funkční jednotkou SMC komplexů je dimer, který společně s dalšími proteiny vytváří prstence kolem DNA duplexů (Chiu et al. 2004; Hirano 2006). Podobnou strukturu má i RAD50, který je

součástí MRN komplexu (obr. 2) (He et al. 2012). Spojení dvou MRN komplexů umožňuje různé způsoby podpory DNA v místě DSB (Lammens et al. 2011).



Obrázek 2.: Struktura SMC a MRN komplexů (Murray a Carr 2008 - upraveno) a model struktury SMCHD1 a AtGMI1 (Böhmdorfer et al. 2011).

Mimo kohezi esenciální pro dělení buněk existuje také dodatečná koheze, která je indukována DSB, a to specificky v S a G₂ fázi buněčného cyklu (Kim et al. 2002). U lidských buněk je směřování kohezínů do míst s DSB závislé na SMC5/6 komplexu (Potts et al. 2006). Součástí SMC1/3 komplexu je také RAD21 (SCC1) (obr. 2), který byl poprvé identifikován u kvasinek skrze citlivý fenotyp vůči IR, a to ještě před objevem jeho role v organizaci sesterských chromatid (Birkenbihl a Subramani 1992). *Arabidopsis* vlastní tři homology RAD21, avšak pouze mutant v AtRAD21.1 je citlivý vůči IR a jeho exprese se zvyšuje po indukci DSB (da Costa-Nunes et al. 2006).

U *Arabidopsis* se nachází dva AtSMC6 proteiny AtSMC6a a AtSMC6b. V semenáčcích je exprese AtSMC6b až dvacetkrát vyšší než exprese AtSMC6a, a tak se AtSMC6b jeví jako hlavní jednotka AtSMC5/6 komplexu. Mutant v AtSMC6b, *atmim*, je citlivý vůči indukci poškození DNA a vykazuje defekt v opravě DSB (Mengiste et al. 1999; Takeda et al. 2004). AtSMC6b participuje na uspořádání sesterských chromatid a tak se podílí až na 75 % všech HR událostí (Watanabe et al. 2009).

Myší SMCHD1 je modelový protein SMCHD skupiny proteinů. SMCHD1 připomíná SMC proteiny, neboť a je tvořen dimerizační doménou a ATPázou, které jsou odděleny dosud neurčeným spojníkem (obr. 2). SMCHD1 se účastní metylace DNA a tím se podílí na inaktivaci X chromozómu (Blewitt et al. 2008). Na základě sekvence *SMCHD1* byl v genomu *Arabidopsis* nalezen dosud neidentifikovaný

strukturní homolog AtGMI1. Název AtGMI1 je odvozen z pozorování indukce jeho exprese po působení IR nebo Mitomycinem C (Böhmdorfer et al. 2011).

Seznam metod

Kultivace rostlin

Stanovení toxicity

Kometový test

Diskuze

Oprava DSB u *Arabidopsis* a *Physcomitrella*

Časově nenáročná příprava vzorků pro kometový test umožňuje detekci rychlé opravy DSB. Hodinové působení BLM o koncentraci 30-50 µg/ml vede k rozsáhlé fragmentaci genomu, která je u obou rostlinných druhů velmi rychle opravena. Kinetika opravy DSB má klasický bifazický průběh. V rámci první fáze je opravena většina indukovaného poškození s poločasem okolo 5 minut. U *Physcomitrella* je rychlá oprava DSB do jisté míry vázána na mitoticky aktivní buňky (Kozák et al. 2009; Kamisugi et al. 2012).

Rozsáhlá fragmentace genomu je biologicky relevantní, neboť 10 dní staré semenáčky *Arabidopsis* a 1 den stará protonema *Physcomitrella* přežívají akutní působení BLM o koncentraci až 50 µg/ml. Většina DSB je opravena správným způsobem, neboť indukce DSB se projevuje jen pomalejším růstem rostlin (Kozák et al. 2009; Kamisugi et al. 2012). Naopak v případě chronické toxicity BLM je *Physcomitrella* výrazně citlivější než *Arabidopsis*. To zřejmě souvisí s obecně vyšší toxicitou DSB vůči mitoticky aktivním buňkám, neboť 1 den stará protonema obsahuje až 50 % mitoticky aktivních buněk (Kamisugi et al. 2012).

Oprava DSB v mutantech C-NHEJ

U *Arabidopsis* a *Physcomitrella* se na pozadí C-NHEJ projevují další dráhy s masivní ligační aktivitou, neboť kinetika opravy DSB je u *atku80*, *atlig4* a *pplig4* srovnatelná s divokým kmenem (wt) (Kozák et al. 2009; Holá et al. 2013).

U *Physcomitrella* je *pplig4* stejně citlivý vůči BLM jako wt, což naznačuje, že by defekt v C-NHEJ mohl být nahrazen HR (Holá et al. 2013). Na druhou stranu, i když se kompletní eliminace HR u *prrad51AB* projevuje výraznou citlivostí vůči DSB (Schaefer et al. 2010), kinetika opravy DSB je srovnatelná s wt (nepublikováno).

U *Arabidopsis* nelze C-NHEJ nezávislou rychlou opravu DSB připsat HR, neboť její úroveň je velmi nízká (Puchta 2005). Na rychlé opravě DSB se tak podílí zbývající A-NHEJ (Charbonnel et al. 2011), které mohou být v podmínkách rozsáhlé fragmentace genomu stejně výkonné jako C-NHEJ (Kozák et al. 2009). O efektivitě A-NHEJ svědčí také schopnost 10 dní starých semenáčků *atku80* a *atlig4* přežít srovnatelně s wt i týdenní působení BLM o koncentraci až 100 µg/ml (Kozák et al. 2009).

AtLIG1 je určující pro rychlou opravu DSB

Kinetika opravy DSB u *atlig4* a *pplig4* poukazuje na efektivitu zbývajících rostlinných DNA ligáz (Kozák et al. 2009; Holá et al. 2013). U *Physcomitrella* nebyla zatím nalezena jiná ligáza než PpLIG4 a PpLIG1, a tak je rychlá oprava DSB u *pplig4* principiálně závislá na PpLIG1.

U *Arabidopsis* se mimo AtLIG4 a AtLIG1 vyskytuje už jen pro rostliny specifická AtLIG6 (Waterworth et al. 2010), avšak kinetika opravy DSB je i u *atlig6* srovnatelná s wt (nepublikováno). Jedinou opravdu esenciální DNA ligázou je replikační AtLIG1 (Waterworth et al. 2010), a tak byli pomocí RNA inhibiční technologie připraveni dva mutanti se sníženým obsahem AtLIG1 (Waterworth et al. 2009).

Zatímco se defekt v AtLIG4 a AtLIG6 v kinetice opravy DSB neprojevuje (Kozák et al. 2009; nepublikováno), pokles v množství AtLIG1 vede až k dvojnásobnému prodloužení první fáze opravy. AtLIG1 tak představuje klíčový faktor rychlé opravy DSB (Waterworth et al. 2009). Úroveň HR je u *Arabidopsis* velmi nízká, a tak AtLIG1 participuje na nějaké A-NHEJ, která je v případě rozsáhlé fragmentace genomu dokonce důležitější než C-NHEJ (Kozák et al. 2009; Waterworth et al. 2009).

Oprava SSB v rostlinách

U *Arabidopsis* a *Physcomitrella* probíhá oprava SSB výrazně pomaleji než DSB. Deficience v AtLIG1 a PpLIG4 se neprojevuje kumulací endogenních SSB, ale vede ke zpomalení opravy modifikovaných bází DNA (Waterworth et al. 2009; Holá et al. 2013).

U *Arabidopsis* se snížená úroveň AtLIG1 projevuje zcela odlišnou kinetikou opravy alkylačního poškození DNA, kde během první hodiny opravy dochází dokonce k nárůstu v množství SSB. Součástí BER je excize modifikovaných bází DNA a vznik SSB, jejichž méně efektivní ligace u *atlig1a* je příčinou počáteční kumulace poškození DNA. AtLIG1 tak představuje rostlinný funkční homolog LIG3 (Cappelli et al. 1997; Waterworth et al. 2009).

U *Physcomitrella* se defekt v PpLIG4 neprojevuje v kinetice opravy DSB, ale překvapivě v kinetice opravy modifikovaných bází DNA. U *pplig4* není defekt v kinetice opravy SSB tak výrazný jako u *atlig1a*, avšak poukazuje na účast PpLIG4 v BER (Waterworth et al. 2009; Holá et al. 2013). PpLIG4 opravuje SSB nezávisle na C-NHEJ, neboť po indukci poškození DNA dochází u *pplig4* ke kumulaci převážně

bodových mutací ve srovnání s *ppku70* a wt (Holá et al. 2013). Na rozdíl od PpLIG4 se AtLIG4 nepodílí na opravě SSB (Córdoba-Cañero et al. 2011).

MRN komplex v opravě DSB u *Physcomitrella*

Pro funkce MRN komplexu u *Physcomitrella* jsou esenciální pouze PpRAD50 a PpMRE11, neboť u mutantů těchto proteinů dochází k defektům v diferenciaci a produkci spor a jsou dokonce citlivější vůči BLM než *pprad51AB* (Markmann-Mulisch et al. 2007; Kamisugi et al. 2012). PpRAD50 a PpMRE11 umožňují vysoce efektivní cílenou integraci cizorodé DNA. V jejich nepřítomnosti klesá účinnost HR na 10 %. PpNBS1 se však na těchto funkcích nepodílí, a tak u mechu může být aktivace ATM a ATR nezávislá na PpNBS1 (Kamisugi et al. 2012; Girard et al. 2002).

I přes citlivý fenotyp vůči BLM a defektu v HR je kinetika opravy DSB u 1 den staré protonemy *pprad50* a *ppmre11* srovnatelná s *ppnbs1* a wt (Kamisugi et al. 2012). Mutanti MRN komplexu jsou efektivní v opravě rozsáhle fragmentovaného genomu, přestože je MRN komplex obecně součástí HR, C- i A-NHEJ (De Jager et al. 2001; Lamarche et al. 2010). U 14 dní staré protonemy *pprad50* se nižší zastoupení mitoticky aktivních buněk projevuje úbytkem části rychlé opravy DSB. S rostoucím stářím tedy PpRAD50 a pravděpodobně celý MRN komplex nabývá na důležitosti (Kamisugi et al. 2012).

Rychlá oprava DSB u *pprad50* a *ppmre11* kontrastuje s jejich extrémně citlivým fenotypem vůči BLM, který by mohl souviset s kumulací mutací DNA. Po indukci DSB se u *pprad50* mutabilita *PpAPT* zvyšuje až o dva řády, avšak u *ppmre11* a *ppnbs1* dochází pouze k násobnému navýšení. Největší vliv na kvalitu opravy DSB má především schopnost MRN komplexu překlenout DSB. Sekvence selektovaných *PpAPT* klonů ukazuje, že za citlivý fenotyp *pprad50* a *ppmre11* může kvalita opravy DSB, respektive kumulace delších delecí. Defekt v MRN komplexu vede i bez indukce DSB k akumulaci transkriptů genů podílejících se na opravě DNA. I přes výrazné navýšení exprese *PpRAD51*, není HR odpovědná za rychlou opravu DSB v *pprad50* a *ppmre11*, neboť navýšení mutability a kumulace delecí poukazují spíše na C- a A-NHEJ (Kamisugi et al. 2012).

Role AtSMC6b, AtRAD21 a AtGMI1 v opravě DSB

U *Arabidopsis* je kinetika opravy DSB u mutantů AtSMC6b (AtMIM), AtRAD21 a AtGMI1 pomalejší ve srovnání s wt (Kozák et al. 2009; da Costa-Nunes et al. 2014; Böhmendorfer et al. 2011). V souladu s předchozí studií se největší defekt projevuje

u *atsmc6b* (Takeda et al. 2004), kde oprava DSB probíhá bez první rychlé fáze, monofazicky a s poločasem kolem 1 hodiny (Kozák et al. 2009). Stabilizací sesterských chromatid se AtSMC5/6 komplex podílí na HR (Watanabe et al. 2009), avšak ztráta rychlé opravy u *atsmc6b* se nedá vysvětlit pouze narušením strukturální podpory HR. Minoritní role HR u *Arabidopsis* (Puchta 2005; Britt a May 2003) a stále funkční A- a C-NHEJ poukazují na nějakou obecnější úlohu AtSMC6b v rychlé opravě DSB. V navrhovaném modelu AtSMC6b přispívá k opravě DSB nejen stabilizací sesterských chromatid, ale také překlenutím DSB podobně jako Ku70/Ku80 heterodimer, nebo MRN komplex (Kozák et al. 2009; Lammens et al. 2011).

Indukce DSB vede k navýšení exprese *AtRAD21.1* až o dva řády, zatímco se exprese *AtRAD21.3* téměř nemění (da Costa-Nunes et al. 2006; da Costa-Nunes et al. 2014). Defekt v kinetice opravy DSB se u *atrad21.1* a *atrad21.3* projevuje především na přelomu mezi rychlou a pomalou fází. Překvapivě oprava DSB u dvojitého mutanta *AtRAD21.1/AtRAD21.3* probíhá stejně rychle jako u wt. U dvojitého mutanta se posun od *AtRAD21* dependentní bezchybné HR k rychlejší a více chybové *AtRAD21* nezávislé opravě projevuje citlivějším fenotypem vůči IR, přičemž mezi *AtRAD21.1* a *AtRAD21.3* panuje synergistický a neredundantní vztah. Navrhovaný model funkce *AtRAD21* v opravě DSB je založen na stabilizaci sesterských chromatid a jejich *de novo* kohezi po indukci DSB. V nepřítomnosti DSB je koheze dána především *AtRAD21.3* a jeho hlavní příspěvek k opravě DSB spočívá už v předem připravené kohezi sesterských chromatid. Naopak masivní indukce exprese *AtRAD21.1* po IR vede ke zvýšení zásoby proteinu *AtRAD21.1*, který pak umožňuje *de novo* kohezi v oblastech s DSB (da Costa-Nunes et al. 2014).

Deleční mutanti *AtGMI1* postrádají dimerizační doménu, a tak snížená úroveň HR u těchto mutantů poukazuje na důležitost dimerizace ve funkci *AtGMI1*. Defekt v kinetice opravy DSB je nejvíce patrný na přelomu mezi rychlou a pomalou fází. Indukce exprese *AtGMII* v reakci na poškození DNA je řízena ATM. Podobnost *AtGMI1* s SMC komplexů je základem modelu, ve kterém *AtGMI1* funguje jako dimer (obr. 2), přičemž stabilizací sesterských chromatid usnadňuje HR (Böhmdorfer et al. 2011). *AtGMI1* je prvním členem SMCHD skupiny proteinů s prokázanou rolí v opravě DNA.

Závěr

V předkládaných publikacích jsou prezentovány výsledky, které do jisté míry mění pohled na opravu DNA u rostlin. Analýza kinetiky opravy DSB a SSB přispěla k těmto závěrům:

- U *Arabidopsis* a *Physcomitrella* je oprava DSB výrazně rychlejší než SSB a poločas první rychlé fáze opravy DSB je kratší než 5 minut.
- Oba rostlinné druhy opravují DSB nezávisle na proteinech C-NHEJ. *Physcomitrella* PpLIG4 se podílí na opravě SSB.
- Extrémně citlivý fenotyp *ppmre11* a *pprad50* vůči BLM nesouvisí s kinetikou opravy DSB, ale s kumulací mutací, především delecí.
- Rychlá oprava DSB u *Arabidopsis* závisí na AtLIG1, která je zároveň funkční homolog LIG3 a podílí se na opravě alkylačního poškození DNA.
- Pomalejší oprava DSB u mutantů proteinů AtSMC6b, AtRAD21 a AtGMI1 souvisí s organizací sesterských chromatid a HR.
- Absolutní závislost rychlé opravy DSB na AtSMC6b naznačuje možnou obecnější funkci tohoto proteinu v opravě DSB.

Abstract

DNA double-strand break (DSB) is a dangerous type of DNA damage, but it also serves in controlled increase of genetic variability. The two major DSB repair pathways are homologous recombination (HR) using homologous sequences and non-homologous end joining (C-NHEJ). Two model plants *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) and the moss *Physcomitrella patens* (*Physcomitrella*) differ in DSB repair strategies. *Arabidopsis* uses C-NHEJ, however *Physcomitrella* prefers HR. These plant models are compared on the basis of measurement of DSB and single strand breaks (SSB) repair by comet assay.

The half-life of the first rapid phase of the DSB repair is about 5 minutes in both plant species. Although the C-NHEJ is considered as the main DSB repair pathway in *Arabidopsis*, rapid repair is independent of AtLIG4 and AtKu80, suggesting the existence of the effective backup non-homologous repair pathways (A-NHEJ). In *Physcomitrella*, the rapid DSB repair dominates in mitotically active cells and is also independent of PpLIG4. Conversely, PpLIG4 is surprisingly involved in the repair of the DNA alkylation damage.

An essential DNA ligase of the rapid DSB repair pathway in *Arabidopsis* is the replication ligase AtLIG1, which is also responsible for the alkylation DNA damage repair, and thus represents a functional homolog of LIG3. The rapid DSB repair is totally dependent on structural maintenance of chromosomes protein (SMC) AtSMC6b. A slight defect in the DSB repair is also observed in mutant of cohesin subunit AtRAD21 and AtGMI1, a newly identified member of a SMC-hinge domain-containing protein family (SMCHD). The role of AtSMC6b, AtRAD21 and AtGMI1 in the DSB repair lays mainly in the organisation of sister chromatids.

The complex of proteins MRE11, RAD50 and NBS1 (MRN) is one of the key sensors and mediators of the DSB repair. In *Physcomitrella*, only PpMRE11 and PpRAD50 participate on MRN complex functions. Extreme sensitivity of *ppmre11* and *pprad50* to the induction of DSB suggests extensive defect in repair, which is not related to the rate of the repair, but rather to the accumulation of mutations, especially deletions. In this regard, PpRAD50 is particularly important, because in its absence the mutability increases up to two orders of magnitude.

Aims of the thesis

- Comparison of the DSB repair kinetics and defining the role of the C-NHEJ in *Arabidopsis* and *Physcomitrella*.
- Characterisation of the MRN complex role in the DSB repair in *Physcomitrella*.
- Defining the role of PpLIG4 and AtLIG1 in the DSB and SSB repair.
- Examining the influence of defects in AtSMC6b, AtRAD21 and SMCHD protein AtGMI1 on the DSB repair.

Introduction

Controlled DSB formation and its subsequent recombinant repair is a part of many natural processes. DSB is also considered as a very dangerous type of DNA damage as an unrepaired break may lead to reorganisation of the genome, the loss of DNA during cell division, and induction of cell death (Bennett et al. 1996). Plants possess most of the mammalian homologous proteins that are involved in the DSB repair. In this manner, plants resemble mammals more than yeast (Shrivastav et al. 2008).

In terms of DNA repair, plants represent a very interesting system. Sessile lifestyle, usage of the strongest biological redox reactions - photolysis of water, creating a plant body by the division of a few apical cells, longevity of some species and the ability of vegetative propagation point to the existence of efficient DNA repair pathways. Also interesting is the viability of single and multiple mutants of repair proteins, that are often lethal in other organisms (Charbonnel et al. 2011).

Induction of DSB

A series of undesired DSB arises from replication fork collapses or topoisomerases failure. Mitochondria and chloroplasts are the major source of radicals (Triantaphylidès and Havaux 2009), whose reaction with DNA can lead to DSB (Kuzminov 2001). An important source of DSB in plants is also the drying process and subsequent re-hydration (Kranter et al. 2010).

Ionizing radiation (IR), which passes through the cell environment and produces radicals, is the most common way of the DSB induction. Another possibility is a natural anti-carcinogenic antibiotic, Bleomycin (BLM), which mimics the effect of IR. BLM chelates metals and after intercalation into DNA it reacts with oxygen and produces superoxide, which in turn damages DNA. The reduction of the complex leads to reactivation s may be followed by further cleavage resulting in the DSB (Strekowski et al. 1988). The intercalation restricts BLM activity close to DNA and therefore BLM produces less SSB per one DSB compared to IR (Povirk et al. 1977).

Measurement of the DSB repair

The DSB repair can be monitored in many ways, but each of them always covers only a part of the investigated area. The various methods allow detection of the physical DNA joining, covalent modification of repair proteins, their spatiotemporal distribution, or sequence modification at the site of repair. The comet assay, which is based

on electrophoresis of individual cells anchored in agarose gel, is one of the conventional methods for direct detection of the genome fragmentation. The resulting object resembles a comet, in which the amount of DNA in the comet tail (% T DNA) correlates with the level of DNA damage in the cell (Ostling and Johanson 1984). The most common is neutral or alkaline version of comet assay that enables the detection of DSB or SSB. An optional incubation of samples with repair endonucleases allows measurement of DNA damage, which itself is not expressed as a break, for example alkylated or oxidised DNA bases (Angelis et al. 1999; Collins et al. 1997; Angelis et al. 2000).

Cytotoxic tests serve not only to identify sensitive mutants of repair proteins, but also reveal the quality of the DSB repair. This can be further studied by determining the mutability of selection gene and sequencing of generated mutations. In *Physcomitrella*, the haploid genome allows the mutation analysis of the gene for adenine phosphoribosyltransferase (*APT*) whose inactivation mutant acquires the ability to grow on media containing otherwise toxic 2-fluoroadenine (Trouiller et al. 2007). The *APT* mutational analysis in combination with the comet assay allows measuring both quality and kinetic of the DSB repair (Kamisugi et al. 2012; Holá et al. 2013).

The DSB repair pathways

C-NHEJ and HR are considered as the main mechanisms of recombination in plants. The necessity of the existence of homologous sequences restricts HR mainly to S and G₂ phase of the cell cycle. Conversely, the C-NHEJ can take place throughout the cell cycle, as it connects the ends of the DNA independently of homology. The resection or extending of the DNA may occur during C-NHEJ and thus it is more prone to change the DNA sequence than HR (Pfeiffer et al. 2004). C-NHEJ is carried out by Ku70/Ku80 and XRCC4/LIG4 complexes (West et al. 2002; van Attikum et al. 2003). RAD51 is crucial for HR (fig. 1) (Abe et al. 2005).

Preference for HR or C-NHEJ reflects to some extent the ability of the targeted integration of foreign DNA. In *Arabidopsis*, the representative of higher plants, C-NHEJ is considered as the main DSB repair pathway, because the level of targeted integration is a thousand times lower compared to random integration (Britt and May 2003; Puchta 2005). Conversely, efficient gene targeting in a member of lower plants, moss *Physcomitrella*, indicates preference for HR (Kamisugi et al. 2005).

In *Arabidopsis*, C-NHEJ mutants are sensitive to IR, however they are still proficient in telomeres fusion, ligation of linearised plasmids and random integration of foreign DNA (Friesner and Britt 2003; Heacock et al. 2004; Gallego et al. 2003). This C-NHEJ independent DSB repair is not mediated by HR (Charbonnel et al. 2011; Decottignies 2013) and sensitive phenotype of *atku80* and *atlig4* suggest a certain mutability of A-NHEJ (West et al. 2002; van Attikum et al. 2003). There are more A-NHEJ pathways in *Arabidopsis*. One of them shows a dependency on microhomology at the site of the DSB repair (MMEJ) and is carried out by AtXPF/AtERCC1 complex and AtMRE11 (Charbonnel et al. 2011; Heacock et al. 2004). Another distinct A-NHEJ is performed by XRCC1 (fig. 1) (Charbonnel et al. 2010; Charbonnel et al. 2011).

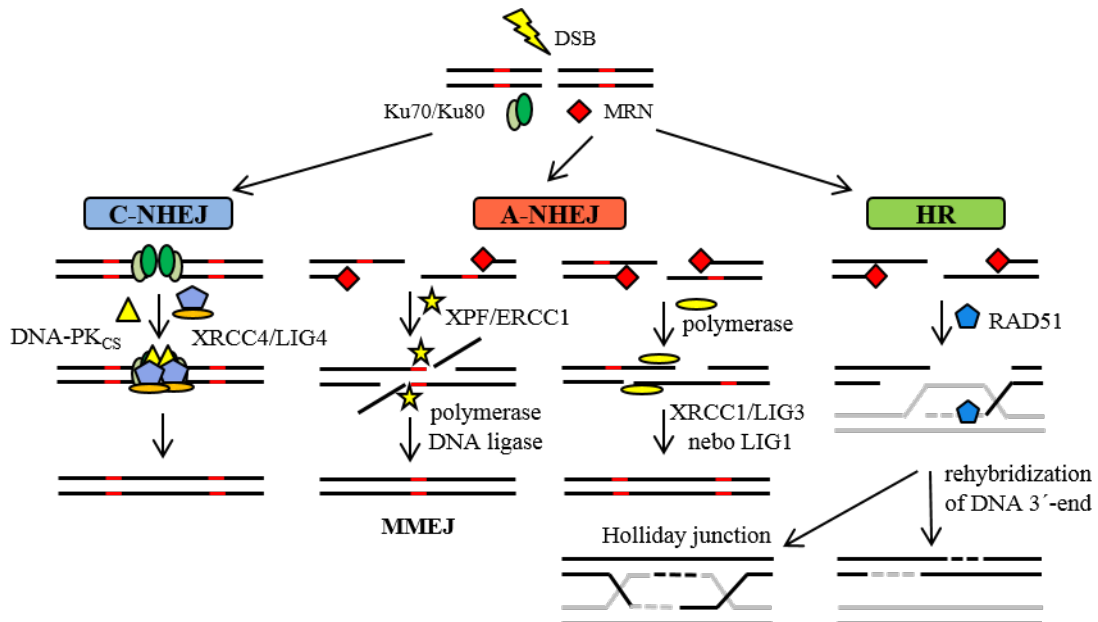


Figure 1.: The DSB repair pathways.

The viability of single as well as multiple mutants of repair proteins allows determination of the DSB repair hierarchy in *Arabidopsis*. In mitotic cells, a defect in all known DSB repair pathways, namely C-NHEJ, HR, A-NHEJ and MMEJ, leads to an extremely sensitive phenotype towards DSB, however the DSB repair is still active in this mutant. This residual ligation activity is reflected in an increased frequency of telomere fusions (Charbonnel et al. 2011).

Plant DNA ligases

Plants differ from other eukaryotes in representation of DNA ligases, wherein their genome lacks any homolog of LIG3, which is a part of a base excision repair

(BER) and A-NHEJ in mammals (Cappelli et al. 1997; Simsek et al. 2011). In *Arabidopsis*, the defect in AtG4 leads to the increased expression of the two remaining DNA ligases, replication AtLIG1 and plant specific AtLIG6 (Furukawa et al. 2015). The cumulative effect of deficiency in both AtLIG4 and AtLIG6 reveals at least two distinct DSB repair pathways in germinating seeds, but viability of the double mutant AtLIG4/AtLIG6 suggests that AtLIG1 itself must be sufficiently effective in the removal of DNA breaks (Waterworth et al. 2010).

MRN complex in the DSB repair

In mammals, MRN complex is considered to be one of the key DSB sensors, which activates signaling kinases ATM and ATR, which in turn trigger a cellular response. ATM interaction with NBS1 is important for its activation (Girard et al. 2002; Lamarche et al. 2010). MRN complex is a significant part of the DSB repair affecting HR, A-NHEJ and C-NHEJ (De Jager et al. 2001; Lamarche et al. 2010). The structure of the MRN complex is determined by RAD50, which enables to over-bridge the DSB (fig. 2) (De Jager et al. 2001). The nuclease activity of MRN complex can lead to a resection of the DSB ends and production of 3'- single-stranded overhangs (Jazayeri et al. 2006). These overhangs are substrate for HR as well as A-NHEJ. However, A-NHEJ is associated with translocations (Simsek and Jasin 2010), and therefore is desirable to restrict MRE11 nuclease activity predominantly to S and G₂. In *Arabidopsis*, MRN complex is essential for meiosis and *atrada50* and *atmre11* are sensitive to induction of DNA damage (Gallego et al. 2001; Bundock and Hooykaas 2002). As in mammals, the plant MRN complex is required for the activation of ATM and ATR (Amiard et al. 2010).

***Arabidopsis* AtSMC6b, AtRAD21 and AtGMI1 in the DSB repair**

Processes associated with the DSB repair occur at the level of chromatin. SMC proteins that form the basis of three different complexes are also involved in the organisation of chromosomes (fig. 2). Complex SMC1/3 is responsible for the sister chromatid cohesion, SMC2/4 complex participates on the chromosome condensation during cell division and SMC5/6 supports HR. The necessity of sister chromatid stabilisation is reflected in defects of HR in mammalian mutants of SMC1/3 and SMC5/6 complexes (Potts et al. 2006). The significance of SMC proteins is supported by the fact that they appeared in evolution before histones (Nasmyth and Haering 2005).

SMC proteins contain N- and C- terminal motifs for ATP binding, which are separated by a linker that has a dimerisation domain in the middle. The folding of SMC protein leads to the formation of ATPase (Haering et al. 2002). A basic functional unit of SMC complexes is a dimer, which forms together with other proteins rings around DNA duplexes (Chiu et al. 2004; Hirano 2006). RAD50, a part of the MRN complex, has a similar structure (fig. 2) (He et al. 2012). The combination of two MRN complexes offers a variety of structural support to DNA in the area of DSB (Lammens et al. 2011).

Beside cohesion that is essential for cell division, there is also an additional cohesion, which is induced by DSB and specifically in the S and G₂ phase of the cell cycle (Kim et al. 2002). In human cells, direction of cohesins to DSB is dependent on SMC5/6 complex (Potts et al. 2006). A part of the cohesin complex is also RAD21 (SCC1) (fig. 2) , which was first identified by a sensitive phenotype against IR in yeast even before the discovery of the cohesins role in the sister chromatid organisation (Birkenbihl and Subramani 1992). *Arabidopsis* contains three homologs of RAD21, but only the mutant of *AtRAD21.1* is sensitive to IR and its expression increases after DSB induction (da Costa-Nunes et al. 2006).

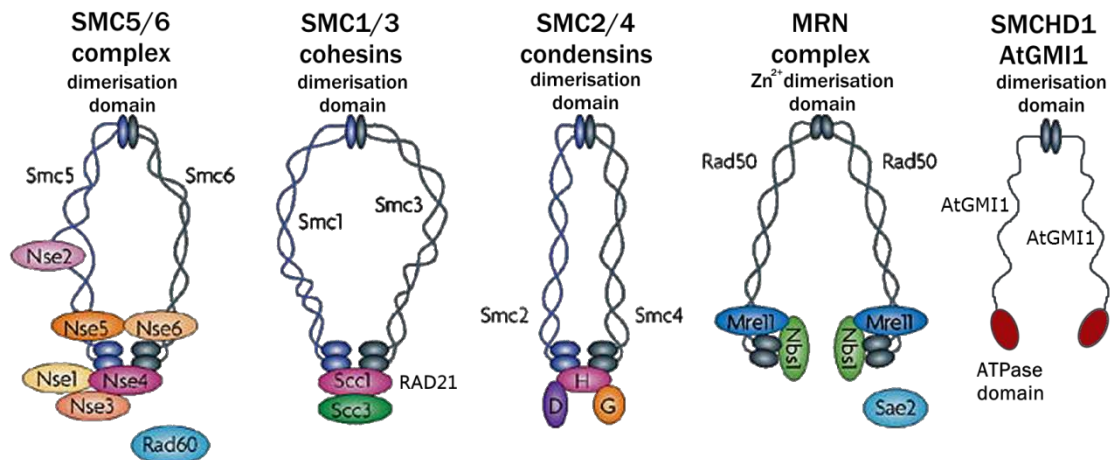


Figure 2.: The structure of SMC and MRN complexes (Murray and Carr 2008 - adapted) and a model of SMCHD1 and AtGMI1 structure (Böhmdorfer et al. 2011).

In *Arabidopsis*, there are two AtSMC6 proteins AtSMC6a and AtSMC6b. In seedlings, the expression of *AtSMC6b* is more than twenty times higher than the expression of *AtSMC6a*, therefore AtSMC6b appears as the main unit of the AtSMC5/6 complex. The mutant of AtSMC6b, *atmim*, is sensitive to the induction of DNA damage and reveals defect in the repair of DSB (Mengiste et al. 1999; Takeda

et al. 2004). AtSMC6b participates on the sister chromatid organisation and thus accounts for 75 % of all HR events (Watanabe et al. 2009).

Murine SMCHD1 is model protein of SMCHD protein family. SMCHD1 resembles SMC proteins, because it is formed by a dimerisation domain and ATPase domain, which are separated by a yet unidentified linker (fig. 2). SMCHD1 participates in DNA methylation and thus contributes to the X chromosome inactivation (Blewitt et al. 2008). Using the sequence of *SMCHD1* allowed the identification of an uncharacterised homolog AtGMI1 in the *Arabidopsis* genome. The name AtGMI1 is derived from the observation of its increased expression after the treatment with IR or Mitomycin C (Böhmdorfer et al. 2011).

List of methods

Plant cultivation

Toxicity testing

Comet assay

Discussion

The DSB repair in *Arabidopsis* and *Physcomitrella*

The time-efficient sample preparation for the comet assay enables detection of the rapid DSB repair. One-hour treatment with at the concentration of 30-50 mg/ml leads to an extensive fragmentation of the genome that is very quickly repaired in both plant species. The kinetics of the DSB repair has a classic biphasic nature. Most of the induced damage is repaired within the first phase with the half-life of about 5 minutes. In *Physcomitrella*, the rapid repair of DSB is to some extent bound to mitotically active cells (Kozák et al. 2009; Kamisugi et al. 2012).

The extensive genome fragmentation is biologically relevant, because 10 days old *Arabidopsis* seedlings as well as 1 day old protonema of *Physcomitrella* survive the acute treatment with BLM at the concentration up to 50 µg/ml. Most of the DSB are repaired in the right way, because the induction of DSB is only reflected by a slower plant growth (Kozák et al. 2009; Kamisugi et al. 2012). Conversely, in the case of the chronic BLM toxicity, *Physcomitrella* is much more sensitive than *Arabidopsis*. This is probably related to a generally higher toxicity of DSB to mitotically active cells, because the one day old *Physcomitrella* protonema contains up to 50 % of mitotically active cells (Kamisugi et al. 2012).

The DSB repair in C-NHEJ mutants

The other repair pathways with the extensive ligation activity operate on the background of C-NHEJ in *Arabidopsis* and *Physcomitrella*, as the DSB repair kinetic in *atku80*, *atlig4* and *pplig4* is comparable to the wild type (wt) (Kozák et al. 2009; Holá et al. 2013).

In *Physcomitrella*, *pplig4* is as sensitive to BLM as wt suggesting that HR may substitute C-NHEJ defects (Holá et al. 2013). On the other hand, although the complete elimination of HR in *pprad51AB* reveals high DSB sensitivity (Schaefer et al. 2010), the DSB repair kinetic is also similar to wt (unpublished).

The rapid C-NHEJ independent DSB repair in *Arabidopsis* cannot be attributed to HR, because of its very low level (Puchta 2005). Thus, remaining A-NHEJ contributes to the rapid DSB repair (Charbonnel et al. 2011), which can be as powerful as C-NHEJ under the condition of the extensive genome fragmentation (Kozák et al. 2009). The effectiveness of A-NHEJ is documented by the ability of 10 days old

seedlings of *atku80* and *atlig4* to survive comparable to wt even a week-long BLM exposure at the concentration of 100 µg/ml (Kozák et al. 2009).

AtLIG1 determines the rapid DSB repair

The DSB repair kinetics in *atlig4* and *pplig4* reveal the effectiveness of the remaining plant DNA ligases (Kozák et al. 2009; Holá et al. 2013). In *Physcomitrella*, no other DNA ligases have been found other than PpLIG4 and PpLIG1, therefore the rapid DSB repair in *pplig4* is fundamentally dependent on PpLIG1. Beside AtLIG4 and AtLIG1, there is only plant specific AtLIG6 in *Arabidopsis* (Waterworth et al. 2010), but the DSB repair kinetic in *atlig6* is comparable to wt (unpublished). The only essential DNA ligase is replication AtLIG1 (Waterworth et al. 2010), therefore two mutants with the reduced amount of AtLIG1 were prepared using the RNA inhibition technology (Waterworth et al. 2009).

While the defect in both AtLIG4 and AtLIG6 is not revealed in DSB repair kinetic (Kozák et al. 2009; unpublished), the decrease in the AtLIG1 amount leads to the twofold prolongation of the first repair phase. Therefore AtLIG1 is the key factor of the rapid DSB repair (Waterworth et al. 2009). As the level of HR is very low in *Arabidopsis*, AtLIG1 participates on some A-NHEJ, which is even more important than C-NHEJ in the case of extensive genome fragmentation (Kozák et al. 2009; Waterworth et al. 2009).

Plant SSB repair

The repair of SSB is slower than DBS in *Arabidopsis* and *Physcomitrella*. The AtLIG1 and PpLIG4 deficiency is not exhibited in the accumulation of endogenous SSB, but leads to the delayed repair of modified DNA bases (Waterworth et al. 2009; Holá et al. 2013).

In *Arabidopsis*, the reduced level of AtLIG1 is reflected in a completely different repair kinetic of the DNA alkylation damage, while within the first hour of the repair there is even an increase in the amount of the detected damage. A part of the BER is excision of modified DNA bases and formation of SSB whose less efficient ligation in *atlig1a* causes the initial DNA damage accumulation. Therefore AtLIG1 represents plant functional homolog of LIG3 (Cappelli et al. 1997; Waterworth et al. 2009).

In *Physcomitrella*, the defect in PpLIG4 is not reflected in the DSB repair kinetic, but surprisingly in the repair kinetic of modified DNA bases. The defect in the repair kinetic of SSB in *atlig4* is not as pronounced as in *atlig1a*, but it points

to the participation of PpLIG4 in BER (Waterworth et al. 2009; Holá et al. 2013). PpLIG4 repairs SSB independently of C-NHEJ, because after the induction of DNA damage *pplig4* shows the accumulation of mostly point mutations in comparison to *ppku70* and wt (Holá et al. 2013). Unlike PpLIG4, AtLIG4 is not involved in the SSB repair (Córdoba-Cañero et al. 2011).

The MRN complex in the DSB repair in *Physcomitrella*

Only PpRAD50 and PpMRE11 are essential for MRN complex functions in *Physcomitrella*, as mutants of these proteins reveal defects in differentiation and spore production and are even more sensitive to BLM than *pprad51AB* (Markmann-Mulisch et al. 2007; Kamisugi et al. 2012). PpRAD50 and PpMRE11 enable a highly efficient targeted DNA integration. In their absence, the HR efficiency drops to 10 %. However, PpNBS1 is not involved in these processes, so the activation of ATM and ATR can be independent of PpNBS1 (Kamisugi et al. 2012; Girard et al. 2002).

The DSB repair kinetic in one day old protonema of *pprad50* and *ppmre11* is comparable to *ppnbs1* and wt, despite the sensitive phenotype towards BLM and HR defect (Kamisugi et al. 2012). Mutants of the MRN complex are efficient in the repair of the extensively fragmented genome, although the MRN complex is generally a part of HR, C- and A-NHEJ (De Jager et al. 2001; Lamarche et al. 2010). The partial loss of the rapid DSB repair in the two weeks old protonema of *pprad50* is caused by the lower amount of mitotically active cells. Therefore, PpRAD50 and probably the whole MRN complex become more important during ageing (Kamisugi et al. 2012).

The rapid DSB repair in *pprad50* and *ppmre11* contrasts with their extremely sensitive phenotype towards BLM, which could be associated with the cumulation of DNA mutations. After the DSB induction, the mutability of *PpAPT* increases up to two orders of magnitude in *pprad50*, but there is only the fold enhancement in *ppmre11* and *ppnbs1*. The ability of the MRN complex to bridge DSB has the greatest influence on the quality of the DSB repair. Sequencing of selected *PpAPT* clones reveals that the sensitive phenotype of *pprad50* and *ppmre11* is caused by the quality of the DSB repair, eventually by cumulation of large deletions. The defect in the MRN complex causes, even without the DSB induction, the accumulation of transcripts of genes involved in DNA repair. Despite the significant increase in the expression of *PpRAD51*, HR is not responsible for the rapid DSB repair in *pprad50* and *ppmre11*,

because the increase in mutability and the cumulation of deletions suggest the involvement of C- and A-NHEJ (Kamisugi et al. 2012).

Role of AtSMC6b, AtRAD21 and AtGMI1 in DSB repair

In *Arabidopsis* the DSB repair kinetics of mutants of AtSMC6b (AtMIM), AtRAD21 and AtGMI1 are slower compared to wt (Kozák et al. 2009; da Costa-Nunes et al. 2014; Böhmendorfer et al. 2011). In the accordance with the previous study the greatest defect is manifested in *atsmc6b* (Takeda et al. 2004), where the DSB repair is carried out without the first rapid phase, monophasically and with the half-life of about one hour (Kozák et al. 2009). The sister chromatid stabilisation by AtSMC5/6 complex contributes to HR (Watanabe et al. 2009), but the loss of the rapid DSB repair in *atsmc6b* cannot be explained only by the disruption of the structural support for HR. The minor role of HR in *Arabidopsis* (Puchta 2005; Britt and May 2003) and still functional A- and C-NHEJ suggest a more general role of AtSMC6b in the rapid DSB repair. In the proposed model, AtSMC6b contributes to the DSB repair not only through the chromatid stabilisation, but also by the bridging of the DSB in a similar manner as Ku70/Ku80 heterodimer or the MRN complex (Kozák et al. 2009; Lammens et al. 2011).

Induction of the DSB leads to the increased expression of *AtRAD21.1* by up to two orders of magnitude, while the expression of *AtRAD21.3* is almost unchanged (da Costa-Nunes et al. 2006; da Costa-Nunes et al. 2014). The defect in the DSB repair kinetic in *atrada21.1* and *atrada21.3* is manifested mainly at the turn of the fast and slow phase. Surprisingly, the DSB repair in AtRAD21.1/AtRAD21.3 double mutant proceeds as quickly as in wt. For the double mutant, the shift from AtRAD21 dependent error-free HR to faster but more error-prone AtRAD21 independent repair is manifested by more sensitive phenotype to IR, wherein between AtRAD21.1 and AtRAD21.3 there is a synergistic and non-redundant relationship. The proposed model of the AtRAD21 function in the DSB repair is based on the sister chromatids stabilisation and their *de novo* cohesion after the DSB induction. In the absence of DSB, the cohesion is mainly based on AtRAD21.3 and its major contribution to the DSB repair lays in the prearranged sister chromatid cohesion. Conversely, the extensive induction of the *AtRAD21.1* expression after IR leads to the increase in the AtRAD21.1 pool, which then enables the *de novo* cohesion in the DSB containing areas (da Costa-Nunes et al. 2014).

The deletion mutants of AtGMI1 lack the dimerisation domain, therefore the reduced levels of HR suggest the importance of the dimerisation in the AtGMI1 function. The defect in the DSB repair kinetics is most evident at the turn between fast and slow phase. The induction of the *AtGMI1* expression after DNA damage is controlled by ATM. The similarity of AtGMI1 and the SMC proteins is the basis of the proposed model, in which AtGMI1 functions as the dimer (fig. 2), wherein the sister chromatid stabilisation facilitates HR (Böhmdorfer et al. 2011). AtGMI1 is the first member of the SMCHD protein family with proven role in the DNA repair.

Conclusion

In the submitted publications are presented results, which to some extent change the view of the plant DNA repair. The analysis of DSB and SSB repair kinetics contributes to the following conclusions:

- In *Arabidopsis* and *Physcomitrella*, the repair of DSB is significantly faster than SSB and the half-life of the first rapid phase of the DSB repair is less than 5 minutes.
- Both plant species repair DSB independently of C-NHEJ proteins. *Physcomitrella* PpLIG4 is involved in the SSB repair.
- The highly sensitive phenotype of *ppmre11* and *pprad50* towards BLM is unrelated to the DSB repair kinetic but to the cumulation of mutations, especially deletions.
- The rapid DSB repair in *Arabidopsis* is dependent on AtLIG1, which is also the functional homolog of LIG3 and is involved in the repair of the alkylation DNA damage.
- The slower repair in mutants of AtSMC6b, AtRAD21 and AtGMI1 proteins is connected with the sister chromatid organization and HR.
- The absolute dependency of the rapid DSB repair on AtSMC6b suggests broader role of this protein in the DSB repair.

Seznam literatury/Literature

- Abe, K. et al., 2005. Arabidopsis RAD51C gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis. *Plant physiology*, 139(2), pp.896–908.
- Amiard, S. et al., 2010. Distinct roles of the ATR kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the maintenance of chromosomal stability in Arabidopsis. *The Plant cell*, 22, pp.3020–3033.
- Angelis, K.J. et al., 2000. Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the comet assay. *Environmental and molecular mutagenesis*, 36(2), pp.146–150.
- Angelis, K.J. et al., 1999. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis*, 20(10), pp.2133–2138.
- van Attikum, H. et al., 2003. The Arabidopsis AtLIG4 gene is required for the repair of DNA damage, but not for the integration of Agrobacterium T-DNA. *Nucleic Acids Research*, 31(14), pp.4247–4255.
- Bennett, C.B. et al., 1996. A Double-Strand Break within a Yeast Artificial Chromosome (YAC) Containing Human DNA Can Result in YAC Loss , Deletion , or Cell Lethality. , 16(8), pp.4414–4425.
- Birkenbihl, R.P. a Subramani, S., 1992. Cloning and characterization of rad21 an essential gene of Schizosaccharomyces pombe involved in DNA double-strand-break repair. *Nucleic acids research*, 20(24), pp.6605–6611.
- Blewitt, M.E. et al., 2008. SmcHD1, containing a structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain, has a critical role in X inactivation. *Nature genetics*, 40(5), pp.663–669.
- Böhmdorfer, G. et al., 2011. GMI1, a structural-maintenance-of-chromosomes-hinge domain-containing protein, is involved in somatic homologous recombination in Arabidopsis. *Plant Journal*, 67(3), pp.420–433.
- Britt, A.B. a May, G.D., 2003. Re-engineering plant gene targeting. *Trends in Plant Science*, 8(2), pp.90–95.
- Bundock, P. a Hooykaas, P., 2002. Severe developmental defects, hypersensitivity to DNA-damaging agents, and lengthened telomeres in Arabidopsis MRE11 mutants. *THE PLANT CELL*, 14(1040-4651), pp.2451–2462.
- Cappelli, E. et al., 1997. Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), pp.23970–23975.
- Collins, A.R. et al., 1997. The comet assay: What can it really tell us? *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 375(2), pp.183–193.

- Córdoba-Cañero, D. et al., 2011. Arabidopsis ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1. *Plant Journal*, 68(4), pp.693–702.
- da Costa-Nunes, J.A. et al., 2006. Characterization of the three Arabidopsis thaliana RAD21 cohesins reveals differential responses to ionizing radiation. *J Exp Bot*, 57(4), pp.971–983.
- da Costa-Nunes, J.A. et al., 2014. The AtRAD21.1 and AtRAD21.3 Arabidopsis cohesins play a synergistic role in somatic DNA double strand break damage repair. *BMC plant biology*, 14, p.353.
- Decottignies, A., 2013. Alternative end-joining mechanisms: A historical perspective. *Frontiers in Genetics*, 4.
- Friesner, J. a Britt, A.B., 2003. Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant Journal*, 34(4), pp.427–440.
- Furukawa, T. et al., 2015. Arabidopsis DNA polymerase lambda mutant is mildly sensitive to DNA double strand breaks but defective in integration of a transgene. *Frontiers in plant science*, 6, p.357.
- Gallego, M.E. et al., 2001. Disruption of the Arabidopsis RAD50 gene leads to plant sterility and MMS sensitivity. *Plant Journal*, 25(1), pp.31–41.
- Gallego, M.E. et al., 2003. Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in Arabidopsis. *Plant Journal*, 35(5), pp.557–565.
- Girard, P.-M. et al., 2002. Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. *Oncogene*, 21, pp.4191–4199.
- Haering, C.H. et al., 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Molecular Cell*, 9(4), pp.773–788.
- He, J. et al., 2012. Rad50 zinc hook is important for the Mre11 complex to bind chromosomal DNA double-stranded breaks and initiate various DNA damage responses. *Journal of Biological Chemistry*, 287, pp.31747–31756.
- Heacock, M. et al., 2004. Molecular analysis of telomere fusions in Arabidopsis: multiple pathways for chromosome end-joining. *The EMBO journal*, 23, pp.2304–2313.
- Hirano, T., 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(5), pp.311–322.
- Holá, M. et al., 2013. Genotoxin induced mutagenesis in the model plant physcomitrella patens. *BioMed Research International*, 2013.

- Charbonnel, C. et al., 2011. Kinetic analysis of DNA double-strand break repair pathways in Arabidopsis. *DNA Repair*, 10, pp.611–619.
- Charbonnel, C. et al., 2010. Xrcc1-dependent and Ku-dependent DNA double-strand break repair kinetics in Arabidopsis plants. *Plant Journal*, 64, pp.280–290.
- Chiu, A. et al., 2004. DNA interaction and dimerization of eukaryotic SMC hinge domains. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), pp.26233–26242.
- De Jager, M. et al., 2001. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Molecular Cell*, 8, pp.1129–1135.
- Jazayeri, A. et al., 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature cell biology*, 8, pp.37–45.
- Kamisugi, Y. et al., 2012. MRE11 and RAD50, but not NBS1, are essential for gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research*, 40(8), pp.3496–3510.
- Kamisugi, Y. et al., 2005. Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research*, 33(19), pp.1–10.
- Kim, J.S. et al., 2002. Specific recruitment of human cohesin to laser-induced DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), pp.45149–45153.
- Kozák, J. et al., 2009. Rapid repair of DNA double strand breaks in Arabidopsis thaliana is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance. *DNA Repair*, 8(3), pp.413–419.
- Kranner, I. et al., 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist*, 188(3), pp.655–673.
- Kuzminov, A., 2001. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), pp.8241–8246.
- Lamarche, B. et al., 2010. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS letters*, 584(17), pp.3682–3695.
- Lammens, K. et al., 2011. The Mre11:Rad50 structure shows an ATP-dependent molecular clamp in DNA double-strand break repair. *Cell*, 145(1), pp.54–66.
- Markmann-Mulisch, U. et al., 2007. Differential requirements for RAD51 in *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis thaliana* development and DNA damage repair. *The Plant cell*, 19(10), pp.3080–3089.
- Mengiste, T. et al., 1999. An SMC-like protein is required for efficient homologous recombination in arabidopsis. *EMBO Journal*, 18(16), pp.4505–4512.

- Murray, J.M. a Carr, A.M., 2008. Smc5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication? *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), pp.177–182.
- Nasmyth, K. a Haering, C.H., 2005. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annual review of biochemistry*, 74, pp.595–648.
- Ostling, O. a Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), pp.291–298.
- Pfeiffer, P. et al., 2004. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. In *Cytogenetic and Genome Research*. pp. 7–13.
- Potts, P.R. et al.. Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *The EMBO journal*, 25(14), pp.3377–3388.
- Povirk, L.F. et al., 1977. Dna double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin. *Nucleic Acids Research*, 4, pp.3573–3580.
- Puchta, H., 2005. The repair of double-strand breaks in plants: Mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of Experimental Botany*, 56, pp.1–14.
- Shrivastav, M. et al., 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research*, 18(1), pp.134–47.
- Schaefer, D.G. et al., 2010. RAD51 loss of function abolishes gene targeting and de-represses illegitimate integration in the moss *Physcomitrella patens*. *DNA Repair*, 9(5), pp.526–533.
- Simsek, D. et al., 2011. DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genetics*, 7.
- Simsek, D. a Jasin, M., 2010. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nature structural a molecular biology*, 17, pp.410–416.
- Strekowski, L. et al., 1988. A biphasic nature of the bleomycin-mediated degradation of DNA. *FEBS letters*, 241, pp.24–28.
- Takeda, S. et al., 2004. BRU1, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in Arabidopsis. *Genes and Development*, 18(7), pp.782–793.
- Triantaphylidès, C. a Havaux, M., 2009. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, 14, pp.219–228.

- Trouiller, B. et al., 2007. Comparison of gene targeting efficiencies in two mosses suggests that it is a conserved feature of Bryophyte transformation. *Biotechnology Letters*, 29(10), pp.1591–1598.
- Watanabe, K. et al., 2009. The STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 5/6 complex promotes sister chromatid alignment and homologous recombination after DNA damage in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, 21(9), pp.2688–2699.
- Waterworth, W.M. et al., 2010. A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant Journal*, 63, pp.848–860.
- Waterworth, W.M. et al., 2009. DNA ligase 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA single and double strand breaks. *BMC plant biology*, 9, p.79.
- West, C.E. et al., 2002. Disruption of the *Arabidopsis* AtKu80 gene demonstrates an essential role for AtKu80 protein in efficient repair of DNA double-strand breaks in vivo. *Plant Journal*, 31(4), pp.517–528.

Životopis

Mgr. Jaroslav Kozák

Narození: 18.9.1981, Přílepy, Česká republika

Vzdělání: 2001 - 2007, Magisterský obor Biochemie, Univerzita Karlova v Praze

Téma diplomové práce: Oprava dvouvláknových zlomů a křížových vazeb DNA u *Arabidopsis thaliana*

Pracovní zkušenosti:

2012 - současnost, Biochemická farmakologie antimetabolitů, Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, v.v.i.

2006 - 2012, Laboratoř pěstování molekul a reparace DNA/Laboratoř biologie pylu, Ústav experimentální botaniky, AV ČR, v.v.i.

Profesní dovednosti:

Oblast specializace: Molekulární a buněčná biologie

Metody: kultivace buněk, UV-VIS, Kometový test, FRET, Termoforéza, western blot, RT-PCR a fluorescenční mikroskopie

Jazykové znalosti:

Angličtina – First Certificate of English, Cambridge ESOL exam, 2012

Curriculum Vitae

Mgr. Jaroslav Kozák

Birth: 18.9.1981, Přílepy, Czech Republic

Education: 2001 - 2007, Masters degree Biochemistry, Charles University in Prague

Thesis title: Repair of double strand breaks and cross-links in *Arabidopsis thaliana*
DNA

Work experience:

2012 - today, Biochemical Pharmacology of Antimetabolites, Institute of Organic
Chemistry and Biochemistry, AS CR, v.v.i.

2006 - 2012, Laboratory of DNA Repair and Molecule Farm/Laboratory of Pollen
Biology, Institute of Experimental Botany, AS CR, v.v.i.

Professional skills:

Subject field: Molecular and cellular biology

Methods: Cells cultivation, UV-Vis, Comet Assay, FRET, Thermophoresis , western blot,
RT-PCR, Life cell imaging and IF

Language skills:

Czech - mother tongue

English - First Certificate of English, Cambridge ESOL exam, 2012

Publikace/Publications

Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis thaliana* is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance.

Kozák, J., West, C. E., White, C., da Costa-Nunes, J. A., Angelis, K. J.

DNA Repair (Amst), 2009, **8**, 413–419.

IF₂₀₀₉: 4,199

DNA ligase 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA single and double strand breaks.

Waterworth, W. M., **Kozák, J.**, Provost, C. M., Bray, C. M., Angelis, K.J., West, C.E.

BMC Plant Biol., 2009, **9**:79

IF₂₀₀₉: 3,744

GMI1, a structural-maintenance-of-chromosomes-hinge domain-containing protein, is involved in somatic homologous recombination in *Arabidopsis*.

Böhmdorfer, G., Schleiffer, A., Brunmeir, R., Ferscha, S., Nizhynska, V., **Kozák, J.**, Angelis, K. J., Kreil, D. P., Schweizer, D.

Plant J., 2011, **67**, 420–433

IF₂₀₁₁: 6,160

MRE11 and RAD50, but not NBS1, are essential for gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*.

Kamisugi, Y., Schaefer, D. G., **Kozák, J.**, Charlot, F., Vrielynck, N., Holá, M., Angelis, K. J., Cuming, A. C., Nogué, F.

Nucleic Acids Res., 2012, **40**, 3496–3510

IF₂₀₁₂: 8,278

Genotoxin induced mutagenesis in the model plant *Physcomitrella patens*.

Holá, M., **Kozák, J.**, Vágnerová, R., Angelis, K. J.

Biomed Res. Int., 2013, **2013**,

IF₂₀₁₃: 2,706

The AtRAD21.1 and AtRAD21.3 *Arabidopsis* cohesins play a synergistic role in somatic DNA double strand break damage repair.

da Costa-Nunes, J. A., Capitão, C., **Kozák, J.**, Costa-Nunes, P., Ducasa, G. M., Pontes, O., Angelis, K. J.

BMC Plant Biol. **14**, 353 (2014).

IF₂₀₁₄: 3,813

Publikované práce nesouvisející s obsahem dizertační práce:

Publication that are not presented in the PhD thesis:

PCT/CZ2015/000052

Helquats with heteroaromatic substituents, preparation thereof, and use thereof as G-quadruplex stabilizers

Inventors: Teplý, F., Hájek, M., Kužmová, E., **Kozák, J.**, Komárková, V., Hubálková, P., Reyes-Gutiérrez, P. E., Jirásek, M., Sonawane, M. R., Joshi, V. D., Severa, L., Novotná, J.

Účast na mezinárodních konferencích:

Participation in international conferences:

- 9th International Comet Assay Workshop, Kusadasi, Turkey, September 2011
- 18th International Microscopy Congress, Prague, September 2014
- 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 2014
- BioVaria, Munich, Germany, May 2015
- 5th International Meeting on Quadruplex Nucleic Acids: G4thering in Bordeaux, France, May 2015
- Microscopy Congress, London, UK, December 2015