

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

Katedra ekologie



Studium indukované mutagenéze u mechu *Physcomitrella patens*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: doc. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Diplomant: Bc. Radka Vágnerová

2015

PROHLÁŠENÍ AUTORA DP

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně a použila všechny literární podklady a informace, které jsem uvedla v seznamu literatury.

V Praze dne 20.4.2015

.....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. Mgr. Bohumilu Mandákovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a především svému konzultantovi RNDr. Karlu J. Angelisovi CSc. za odbornou pomoc, cenné připomínky a čas, který mi věnoval. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Marcele Holé a Petře Rožnovské za trpělivost při vysvětlování metod a provádění experimentů.

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Katedra ekologie

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Radka Vágnerová

Regionální environmentální správa

Název práce

Studium indukované mutagenese u mechu *Physcomitrella patens*

Název anglicky

Study of Induced Mutagenesis in the Moss *Physcomitrella patens*

Cíle práce

Studium indukovaných mutací v mechu *Physcomitrella patens* na molekulární úrovni bazí DNA.

Metodika

Laboratorní část:

1. Pěstování a uchovávání linií mutant mechu *Physcomitrella patens*.
2. Působení genotoxiny, selekce mutant, analýza poškození DNA, izolace genomové DNA, PCR APT lokusu a analýza indukovaných mutací sekvenováním.
3. Konstrukce transformačních RNAi vektorů: pomnožování plazmidů v bakteriích, izolace DNA, restriční štěpení, ligace, transformace bakterií, PCR, elektroforéza.
4. Transformace mechu *Physcomitrella patens*: Příprava transformačních částic, nastřelení a selekce transformant.
5. Studium fenotypu mutant mechu *Physcomitrella patens*.

Diplomová práce/příprava:

1. Zdůvodnění výběru tématu, popis a uplatnění *Physcomitrella patens* jako pokusného/modelového organismu Literární přehled a úvod diplomové práce.
2. Popis použitého materiálu a metod.
3. Popis získaných výsledků, jejich analýza (např. statistika) a rozbor.
4. Popis typů poškození DNA a procesů opravy DNA.
5. Diskuse získaných výsledků a závěr práce.

Doporučený rozsah práce

60 stran

Klíčová slova

biolistická transformace, transformační vektory, kometový test, reparační kinetika, APT mutageneze

Doporučené zdroje informací

ALBERTS B. et al., 1998: Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky, Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, 630 s.

COVE D. J. et al., 1997: Mosses as model systems. Trends Plant Science 2: 99-105.

HOLÁ M. et al., 2013: Genotoxin induced mutagenesis in the model plant *Physcomitrella patens*, Biomed research international, 2013: 535049.

KAMISUGI B. et al., 2012: MRE11 and RAD50, but not NBS1, are essential for gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. Nucleic acids research 40: 3496-3510.

Předběžný termín obhajoby

2015/06 (červen)

Vedoucí práce

doc. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 1. 4. 2014

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 1. 4. 2014

prof. Ing. Petr Sklenička, CSc.

Děkan

V Praze dne 17. 03. 2015

ABSTRAKT

Mech *Physcomitrella patens* (*P. patens*) je ve srovnání s jinými rostlinami výjimečný vysokou frekvencí homologní rekombinace, haploidním stádiem gametofytu a rychlým růstem filament protonemy, což jej činí vynikajícím modelovým organismem pro genetické studie i biotechnologické aplikace.

Proto se moje diplomová práce zabývá mutagenézí indukovanou v jaderné DNA působením genotoxiny a jejich analýzou na molekulární úrovni sekvenováním právě u tohoto modelového organismu. Byla zjišťována frekvence vzniku *apt* mutant (mutation rate) u *P. patens* divokého typu a linií s defekty v opravě DNA (*ppmre11*, *pprad50*, *pplig4* a *ppku70*). U vybraných *apt* mutant byl mutovaný *APT* lokus analyzován sekvenováním.

Poškození DNA bylo indukováno genotoxiny imitujícími mutagenní jevy v přírodě: bleomycin cytostatikum mimikující ionizující záření, UV záření a chemický mutagen methylnmethansulfonát (MMS) způsobující alkylační poškození. Používala jsem jednodenní kulturu mechu *P. patens* s 50% dělicích se apikálních buněk, která je modelem aktivně rostoucí tkáň a zároveň je stádiem nejvíce náchylným k indukci mutací.

klíčová slova: působení genotoxiny, *APT* mutagenese, biolistická transformace, selekce,

ABSTRACT

The moss *Physcomitrella patens* (*P. patens*) is in comparison to other plants exceptional for its high frequency of homologous recombination, haploid state of gametophyte, and rapid growth of protonema filaments, what makes moss an excellent plant model for genetic studies as well as biotechnological applications.

Therefore this diploma thesis is focused on genotoxin - induced mutations in nuclear DNA and their detailed analysis on molecular level by sequencing in model *Physcomitrella patens*. Mutation rate of *apt* appearance was measured in *P. patens* wild-type and moss lines with defects in DNA repair (*pplig4*, *ppku70*, *pprad50*, *ppmre11*). Mutated *APT* locus of selected *apt* mutants was sequenced.

For induction of DNA damage were used genotoxins mimicking mutagenic attacks in environment: bleomycin – cytostatic drug mimicking ionizing radiation, UV irradiation and chemical mutagen methyl methanesulfonate (MMS) alkylating DNA. For this studies was used a one-day-old protonema culture of the moss *P. patens* with 50% of dividing apical cells, which is a model of an actively growing tissue, the most vulnerable stage for the induction of mutations.

key words: genotoxin treatment, *APT* mutagenesis, biolistic transformation, selection

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2FA	2-fluoroadenin
6-4PP	6'-4' pyrimidin-pyrimidon fotoprodukt
AP	apurinové/apyrimidinové místo
APT	enzym (adenin fosforibosyltransferáza)
ATM	kináza (<i>Ataxia telangiectasia</i> mutated)
ATR	kináza (<i>Ataxia telangiectasia</i> Rad3 related)
BER	excizní reparace bází
BLM	bleomycin
CPD	cyklobutan pyrimidinový dimer
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PKcs	katalytická podjednotka DNA proteinkinázy
DSB	dvouvláknový zlom DNA
G418	geneticin sulfát – selekční antibiotikum
gDNA	genomová DNA
GUS	β -glukuronidáza
HR	homologní rekombinace
MRN	komplex proteinů MRE11, RAD50 a NBS1
MMS	methylnmethansulfonát
NER	nukleotidová excizní reparace
NHEJ	nehomologní spojování konců (non homologous end-joining)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
rpm	otáčky za minutu
SSB	jednovláknový zlom DNA
Wt	rostlina/linie divokého typu (wild-type)

1. OBSAH

2. ÚVOD	11
2.1. Rostlinný model <i>Physcomitrella patens</i>	13
2.2. <i>APT</i> jako selekční marker mutagenese	15
2.3. Mutagenese DNA.....	15
2.4. Mutageny použité k poškození DNA.....	16
2.4.1. Bleomycin	16
2.4.2. UV záření	17
2.4.3. MMS	17
2.5. Transformace jako způsob mutagenese	18
2.6. Oprava DNA	19
2.6.1. Oprava DSB v DNA.....	20
2.6.2. Excizní opravy DNA.....	21
2.6.3. Fotoreaktivace	22
2.7. RNA interference	22
2.8. Konstrukce transformačních vektorů	23
2.9. Analýza poškození DNA	24
2.9.1. Sekvenování DNA	25
3. CÍLE PRÁCE	26
4. MATERIÁLY A METODY	27
4.1. Rostlinný materiál	27
4.1.1. Kultivace <i>P. patens</i>	27
4.1.1.1. Kultivace mutantních linií <i>P. patens</i> pro dlouhodobé udržování.....	27
4.1.1.2. Příprava Petriho misek	27
4.1.1.3. Příprava celofánových disků	28
4.1.1.4. Pomnožování <i>P. patens</i>	28
4.1.1.5. Testování kontaminace	28
4.1.2. <i>APT</i> mutagenese.....	29
4.1.2.1. Příprava jednodenní suspenze mechu	29
4.1.2.2. Působení genotoxiny	29
4.1.2.3. Selekce mutant	31
4.1.3. Nastřelování a selekce transformant	31
4.2. Molekulárně biologické metody	34
4.2.1. Klonování a konstrukce transformačních vektorů	34
4.2.2. Sekvenování DNA	35
5. VÝSLEDKY	36
5.1. Citlivost Wt a testovaných linií <i>P. patens</i> na bleomycin, UV záření a MMS	36
5.2. Porovnání testovaných mutantních linií <i>P. patens</i> z hlediska přirozených dispozic k mutacím	37
5.3. Analýza mutací.....	38
5.4. Rozložení mutací testovaných mutantních linií <i>P. patens</i> v <i>APT</i> lokusu	38
5.5. Konstrukce transformačních RNAi vektorů.....	39
6. DISKUZE.....	42
6.1. Citlivost na působení mutageny	42
6.2. <i>APT</i> mutagenese	42
6.2.1. Účinnost testovaných mutagenů	42
6.2.2. Analýza mutací.....	44
7. ZÁVĚR	46
8. VLASTNÍ PUBLIKACE	47
9. SEZNAM LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ	47

PŘÍLOHY	52
Příloha č. 1: složení roztoků.....	53
Příloha č. 2: použitý materiál	56
Příloha č. 3: použité chemikálie	56
Příloha č. 4: použité přístroje	57
Příloha č. 5: použitý software.....	58
Příloha č. 6 : vlastní publikace	59

2. ÚVOD

V důsledku industrializace, rozvoje zemědělství a ostatních civilizačních vlivů dochází přímo či nepřímo k ovlivnění životního prostředí. Proto je důležité tyto změny sledovat na řadě úrovní, od genetických, fyziologických, molekulárních, po ekologické. Výsledky pozorování pak indikují konkrétní negativní změny v oblasti ekologie. Některé z těchto negativně jevů lze pozorovat v krátkém časovém období, přestože často z velké části jde o změny, které jsou viditelné až delším časovým intervalem. Dnes již jde o celou škálu negativních změn. Příkladem jsou zhoršené klimatické podmínky, zvětšující se ozónová díra, tání permafrostu na severní, ale ve velké míře i na jižní polokouli, snižování biodiverzity druhů, nárůst zasolení půd v důsledku sucha, popřípadě vysoušení, zvyšující se koncentrace agrochemikálií a těžkých kovů v půdě, vysoké dávky UV záření, kontaminace z industriálních a energetických havárií, a v neposlední řadě i nesnáze s likvidací odpadů (*Braniš, 2004*).

Výjimečně dochází ke znečištění přírodních zdrojů a ekosystémů způsobem, který lze snadno zjistit a následně sanovat, jako například dopravní nebo průmyslové havárie. Větším problémem jsou však dlouhodobé kontaminace chemikáliemi z běžných činností domácností, průmyslové či zemědělské výroby, např. používání hnojiv, léčiv a jejich metabolitů. Často se pak projevuje nízká odolnost původních druhů a naopak velká přizpůsobivost plevelů či parazitů a jejich následné přemnožení. V další fázi se pak tyto nebezpečné látky mohou nenásilně dostat například do půd a stát se součástí potravního řetězce. Takto mohou ve značné míře kontaminovat některé méně odolné organismy (*Kroupa a Říha, 2010*).

V konečném důsledku tak dochází například ke zvýšené rezistenci bakterií vůči antibiotikům, mutacím rostlin, ale i k pozorovatelným změnám jejich projevů, které mohou mít nepatrný, ale i významný vliv na fenotyp. Viditelných ukazatelů použitelných k detekci poškození základních molekulárních struktur buněk rostlin je mnoho, např. poruchy růstu, předčasné stárnutí, žloutnutí listů, defoliace či nekróza (*Alberts a kol., 2004*).

Studium takových biologických aspektů je nákladné, komplikované a vyžaduje dlouhodobé pozorování. V současnosti jsou některé biologické účinky kontaminantů prokázány, nicméně řada dalších je stále předmětem diskuzí a výzkumu (*Alberts a kol., 2004*). Jedním z těchto směrů je snaha prokázat kauzalitu vznik poškození DNA s následnou indukci mutací, kdy je na základě molekulárně biologických a genetických

studií možné zjistit a publikovat nové, dosud neznámé souvislosti působení vlivu životního prostředí.

Takovým výzkumem se zabývají i na Ústavu experimentální botaniky, AV ČR, kde se osobně podílím na výzkumu poškození a reparace DNA a indukované mutagenese na mechu *Physcomitrelle patens* (*P. patens*). Předmětem diplomové práce je *P. patens* (čepenka odstálá), která je použita jako modelová rostlina pro studium změn v důsledku poškození a reparace DNA a následné mutagenese na molekulární úrovni.

I když se podobný výzkum na rostlinách provádí převážně na *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*, huseníčku rolním), *Zea mays* (kukuřici seté) nebo *Nicotiana tabacum* (tabáku virginském) (*Soltis a Soltis, 1999*), byl zvolen mech *P. patens* pro řadu unikátních vlastností, které z něj činí vhodný model pro uvedený druh výzkumu. Jde především o vysokou frekvenci homologní rekombinace (HR), rychlý růst filament - vláken protonemy, haploidní stádium gametofytu a v neposlední řadě nenáročnost kultivace (*Holá a kol., 2013; Šmídková a kol., 2010*).

Podobně jako často u *A. thaliana*, byl použit přístup reverzní genetiky, tedy metody studia od genu k fenotypovému projevu, při které se studuje funkce vybraného genu mutagenézí, to je jeho vyřazením nebo modulací exprese (*Reski, 1998*). K masivnímu využívání reverzní genetiky u *A. thaliana* přispívá volně dostupná databáze genetických a molekulárních dat a v neposlední řadě saturovaná knihovna inserčních T-DNA mutant. Tato databáze obsahuje především kompletní sekvenci genomu spolu s anotovanou strukturou jednotlivých genů, informace o expresi, produktech, genomové mapy a genetické markery (*Jander a kol., 2002*). Genom *P. patens* je také celý sekvenován a většina genů anotována. Na základě těchto informací a vzhledem k vysoké HR a haploidnímu stavu vede přímá cesta k tvorbě inserčních, částečně nebo zcela delečních (replacement) mutant, popřípadě mutant vytvořených na základě RNA interference.

Proto, že řada mechanismů je univerzální, t.j. sdílená všemi živými organismy (*Alberts a kol., 2004*), lze i studiem na rostlinných modelech získat pohled nejen na způsoby odpovědi rostlinné buňky na poškození genomu, ale také objasnit další mechanismy podílející se na udržení genomové stability.

Diplomová práce se zabývá studiem mutagenese a reparace DNA u divokého typu a některých linií *P. patens* defektních v reparaci DNA na molekulární úrovni.

Vychází z práce *Kamisugi a kol. (2012)* a rozšiřuje studium genotoxicity u mutantních linií *ppmre11*, *pprad50*, *pplig4* a *ppku70*.

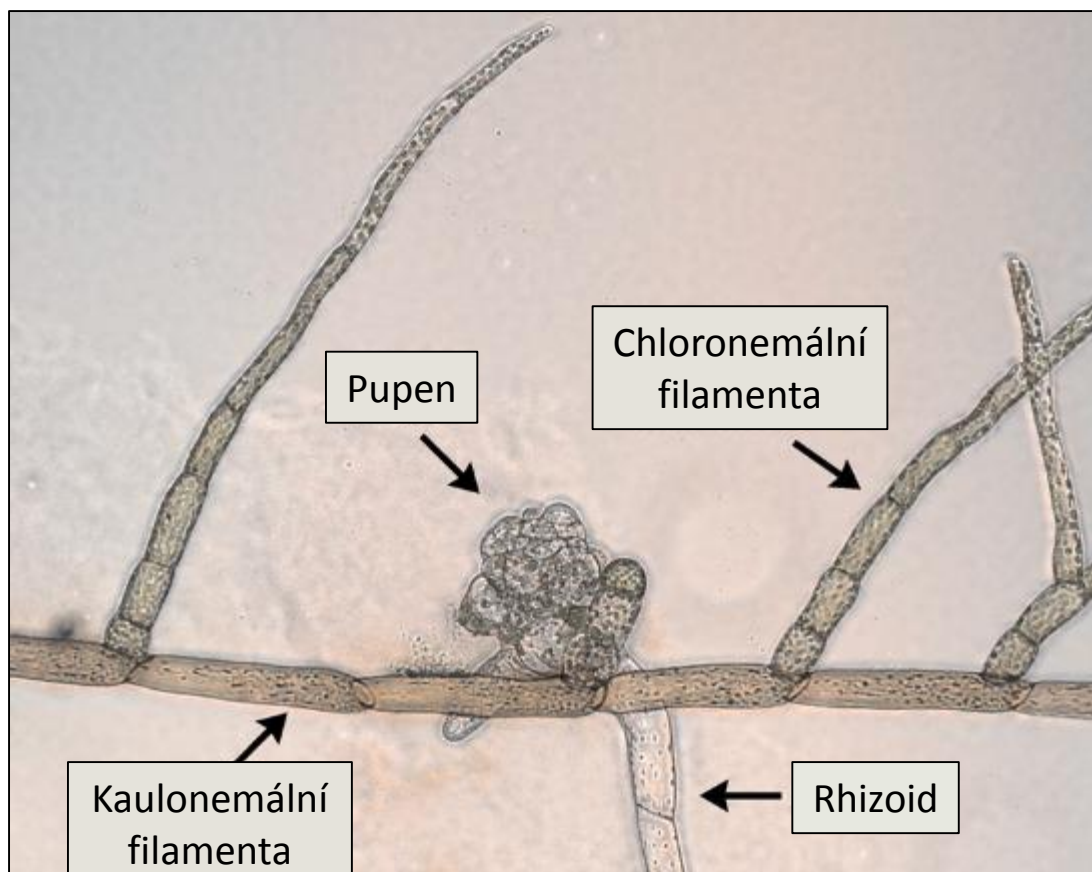
2.1. Rostlinný model *Physcomitrella patens*

P. patens je využíván jako experimentální organismus více než 80 let. V posledních patnácti letech zájem o využití *P. patens* významně stoupá kvůli unikátním vlastnostem, jednoduché a nenáročné manipulaci a znalosti sekvence genomu. V životním cyklu *P. patens* ve srovnání s mnohými jinými pokusnými organismy převažuje haploidní stadium a díky tomu umožňuje aplikace experimentálních technik podobným mnohým technikám využívaných na bakteriích. Vzhledem k jednoduchosti stavby svého těla je také vhodný pro studium vývoje a růstu. Výzkum *P. patens* navíc napomáhá objasnit rostlinnou evoluci, kdy se rostliny po přechodu na souš rozdělily na rostliny cévnaté a mechorosty (*Cove a kol., 2009*).

Životní cyklus *P. patens* se stejně tak jako u všech mechů vyznačuje střídáním dvou generací. První generací je haploidní gametofyt a druhou diploidní sporofyt, ve kterém se vytvářejí haploidní výtrusy - spóry. Z výtrusů vyrůstají vláknité struktury - protonemata složené ze dvou typů buněk. Prvním typem je větvičí se chloronema, tvořena převážně chloroplasty, a druhým buněčným typem je kaulonema, vyznačující se rychlým filamentárním růstem. Pro vědecké účely se využívá převážně haploidní stadium (*Schaefer a Zrýd, 2001*).

Kromě převažujícího haploidního stádia vývoje se *P. patens* oproti ostatním rostlinným modelovým systémům vyznačuje i celou řadou jiných výhod. Patří mezi ně malá velikost rostlinky, rychlý růst filament během raného vegetativního stádia, snadná kultivace na anorganických médiích a několik možností dlouhodobého skladování (*Holá a kol., 2013*).

V neposlední řadě je *P. patens* jedním z mála mnohobuněčných organismů s vysokou účinností HR, jejíž frekvence je stejně vysoká jako u kvasinek. Díky vysoké frekvenci HR je možné snadno připravit tzv. knock-out mutanty/cílené vyřazení genu (*Hohe a kol., 2004*). *P. patens* je jedním z mála organismů, u kterého lze cíleně mutovat geny. Je tedy možné vybírat konkrétní sekvence, popř. geny, které se dají buď pozměnit, nebo zcela nahradit a místo nich vnášet sekvence/geny, které jsou předmětem zájmu. Tímto se následně zjišťují funkce jak kontrolních sekvencí, tak kódujících sekvencí konkrétních genů (*Trouiller a kol., 2006*).



Obr. 1: Typy filament protonemy *P. patens*. Obrázek ukazuje různé typy filament tkáně protonemy *P. patens*. Kaulonemální filamenta jsou silně pigmentovaná s šikmými příčnými stěnami a nízkým počtem chloroplastů. Naopak chloronemální filamenta mají kolmé buněčné stěny a více chloroplastů. Na kaulonemálních filamentech jsou obvykle tvořeny pupeny, ze kterých se vyvíjejí vlastní dospělé rostlinky - gametofory (upraveno dle *Thelander a kol., 2004*).

Její růstový vývoj je relativně prostý a generuje jen několik druhů pletiv obsahujících omezený počet buněčných typů. Ačkoli mechy nemají cévní svazky, pravé kořeny, stonky, listy a semena, mnoho signálních drah známých u krytosemenných rostlin, bylo objeveno i u mechu. Například fytohormony auxin, cytokinin, kyselina abscisová, stejně tak jako fotomorfogenetické pigmenty fytochrom a kryptochrom, jsou všechny zapojeny v různých, ale překrývajících se biochemických drahách a jsou spojeny s jasnými vývojovými fenotypy (*Cove a kol., 2009*).

Moderní historie *P. patens* popisuje úspěšné izolování a genetické analýzy auxotrofních mutantů pro thiamin, kyselinu nikotinovou a para- aminobenzoát. Tento výzkum dal podnět skupině Davida Cova v Cambridgi, později v Leedsu a skupině Wolfganga Abela na univerzitě v Hamburku k dalšímu rozvoji *P. patens* jako modelového genetického systému. Jejich práce vedla k izolaci a biologické

charakterizaci několika biochemických mutantů vyvolaných chemickými mutagenézemi. Právě David Cove jako první uvedl *P. patens* do praxe. (Abel a kol., 1989; Ashton a Cove, 1977; Ashton a kol., 1979; Cove a kol., 1997).

2.2. APT jako selekční marker mutageneze

APT (adenin-fosforibosyltransferáza) je enzym dráhy syntézy nukleotidů, konkrétně purinů, který převádí adenin na AMP (adenin monofosfát). Ztráta jeho funkce vede ke vzniku linií rostlin rezistentních k jinak toxickým analogům adeninu, jako např. 2-fluoradenin (2FA) (Troullier a kol., 2007; Holá a kol., 2013). Inaktivace mutací tak může být použita jako selekční marker pro stanovení mutátorového genotypu a pro analýzu mutací v *APT* lokusu na úrovni nukleotidů (Holá a kol., 2013).

Tento enzym byl objeven u všech bakterií, archeí i eukaryot, kde je kódován *APT* genem, který byl klonován a sekvenován u mnoha organismů (Crother a Taylor, 1998). Ačkoli se APT doposud nepodařilo krystalizovat, je známo, že funguje jako dimer a ke své funkci vyžaduje ionty Mg^{2+} (Crother a Taylor, 1998).

2.3. Mutageneze DNA

Mutagenezí se rozumí proces, při kterém dochází k mutacím, tedy změně původní sekvence DNA, v jejímž důsledku je úplně, nebo částečně změněna funkce. K mutacím může docházet spontánně v přírodě, nebo v důsledku působení fyzikálních, chemických, ale i biologických mutagenů. Mutageneze je jako první krok často spojována s karcinogenezí (kancerogenezí), protože mutace v některých genech může vést k nekontrolované proliferaci buněk, tvorbě nádorů, popřípadě různým formám dědičných zátěží/onemocněním (Papavramidou a kol., 2010). Nelze však zaměňovat pojem mutagen a karcinogen. Mutagen je činidlo (fyzikální působení nebo chemická látka) vyvolávající změny genetické informace, zatímco karcinogen je látka, která vyvolává neregulované růstové procesy v buňkách nebo organismech, tedy mutace pouze ve specifických genech buněk nebo tkáních mnohobuněčných živočichů, vedoucí k rakovinnému bujení. Ačkoli mutagen a karcinogen nejsou synonyma, schopnost látky vyvolat mutace a jeho schopnost vyvolat rakovinu jsou silně propojeny. Mutageneze se týká procesů, které mají za následek genetické změny, a karcinogeneze (procesy vývoje nádoru) často jsou důsledkem mutagenních událostí. Ne vždy však u každého mutagenu byla prokázána karcinogenita (Ames, 1984).

Mutageny mohou být fyzikálního, chemického nebo biologického původu. Většina chemických mutagenů jsou genotoxiny chemicky modifikující DNA, jako např. alkylační látky alkylující v různých polohách jednotlivé báze, popřípadě přímo, nebo v důsledku reparace vedou k jedno, nebo dvouvláknovým zlomům DNA, jako např. bleomycin nebo křížové vazby (cross-links) DNA vytvářející cisPt. Mezi fyzikální mutageny patří různá záření, např. gama záření, rentgenové záření a UV záření, a záření částic, jako je například záření alfa a beta částic a vyzáření rychle letících neutronů (*Kodym a Afza, 2003*).

2.4. Mutageny použité k poškození DNA

Pro výzkum genetických mutací byly pro tuto práci zvoleny mutageny imitující mutagenní jevy, ke kterým dochází ve volné přírodě spontánně v důsledku různých faktorů životního prostředí. Jmenovat lze především přirozené, nebo indukované procesy spojené s produkcí kyslíkových částic/radikálů (ROS) vedoucí k oxidativnímu poškození DNA, fyzikální poškození v důsledku ozáření nebo chemické kontaminační látky. Od každého typu faktoru byl zvolen jeden mutagen – pro oxidativní poškození bleomycin, pro poškození fyzikálními jevy UV záření a pro chemické poškození melhyl-methansulfonát (dále jen MMS).

2.4.1. Bleomycin

Bleomyciny jsou klasifikovány jako cytotoxická glykopeptidová antibiotika, původem z bakterie *Streptomyces verticillus*. Označují celou rodinu strukturálně příbuzných sloučenin. Ve zdravotnictví se běžně využívají jako protinádorové antibiotikum při léčbě Hodgkinova lymfomu, při léčbě kožních nádorů a některých dalších maligních nádorů, např. v genitální oblasti. Vážou se na DNA rakovinných buněk tak, že se buňky nemohou dělit ani růst (*Lewis a Nydorf, 2006*). K lékařskému použití jsou komerčně dostupné léky jako např. Bleomedac (Medac, GmbH), kde účinnou látku je bleomycin-sulfát. 1 mg suché hmoty tohoto léku zde odpovídá 1500 až 2000 m.j. bleomycin-sulfátu (*Medac, 2015*).

Bleomyciny mají schopnost generovat ROS uvnitř buňky a jejich interakce s DNA pak vede k oxidativnímu poškození bází a jedno a dvouvláknovým zlomům DNA (*Povirk, 1996*).

Kyslíkové radikály kromě indukce fyzikálním nebo chemickým působením mohou v buňkách také vznikat přirozeně jako vedlejší produkt vnitřního metabolismu kyslíku - často za působení vnějších podnětů, jako jsou sucho a slanost. Aby bylo možné pochopit, jak se rostlina vyrovnává se stresem, je nutné zohlednit jeho celkový dopad na rostlinu, který působí na všech úrovních – od molekulární po celkový vliv na organismus, zejména jak oxidační stres ovlivňuje genetický materiál buněk a jaké případné změny jsou dočasně nebo trvale vyjádřeny v rostlinném fenotypu (*Holá a kol., 2013*).

2.4.2. UV záření

Ozáření DNA UV světlem vede ke specifickému účinku, neboť pohlcovat ultrafialové paprsky mohou jen molekuly, ve kterých jsou zastoupeny dvojnásobné vazby. Každá taková molekula má své vlastní absorpční spektrum s maximy při určitých vlnových délkách. Báze nukleových kyselin mají maximum absorpce v oblasti 260 – 280 nm. Ultrafialové paprsky v této oblasti vykazují přímý účinek na nukleové kyseliny (*Rosypal, 2000*).

Absorbce UV světla způsobuje v molekule DNA dimerizaci dvou sousedních pyrimidinových molekul nacházejících se na stejném polynukleotidovém řetězci (*Rosypal, 2000*). Nejčastějšími poškozeními, které v molekule DNA následkem UV záření vznikají, jsou cyklobutan pyrimidinové dimery (CPD) a 6'-4' pyrimidin-pyrimidon fotoproducty (6-4 PP) (*Holá a kol., 2014*).

Většina UV fotoproductů je v rostlinách opravena pomocí enzymu fotolyázy, která se aktivuje modrým (viditelným) světlem (320-450 nm). Oprava při viditelném světle je účinná, bezchybná, nicméně k úplnému odstranění 6-4 pyrimidin-pyrimidonových fotoproductů je zapotřebí alespoň 2 hodiny času. Během této doby mohou fungovat i jiné opravné mechanismy. Na rozdíl od fotoreaktivace na světlo, oprava ve tmě (dark repair) přímo neumožňuje zvrátit poškození DNA, ale nahrazuje poškozenou DNA za DNA s novými nepoškozenými nukleotidy. Pokud nedochází k fotoreaktivaci, jsou fotodimery obdobně jako u jiných organismů včetně savců opraveny pomocí nukleotidové excizní reparace (dále jen NER)

2.4.3. MMS

MMS je alkylačním činidlem DNA, již po mnoho let se využívá pro vyvolání mutagenese a často byl uplatňován i při studiích rekombinace. MMS modifikuje

guanin na 7-methylguanin a adenin na 3-methyladenin, v důsledku čehož způsobuje chybné párování bazí a následně blokuje replikaci. Poškození DNA způsobené MMS, stejně tak jako ostatními alkylačními látkami, je převážně opraveno pomocí bázev excizní reparační (dále jen BER) (*Lundin a kol., 2005*).

2.5. Transformace jako způsob mutagenese

Pro vytváření cílených transgenních organismů se využívají různé metody modifikace jaderné/genomové DNA. Těchto metod existuje celá řada, např. u rostlin lze jmenovat metodu transformace pomocí T-DNA *Agrobacterium tumefaciens*, nebo transformací DNA dopravenou do buňky na pevných částicích biolisticky, v roztoku elektroporací nebo transformací protoplastů sraženinou DNA pomocí polyethylenglykolu (dále jen PEG) (*Kawai a kol., 2010*).

V diplomové práci jsem použila biolistickou transformaci (bombardování rostlinné tkáně částicemi) založenou na vnášení DNA pomocí mikročástic zlata nebo wolframu (*Sanford, 1988*). Existují dva systémy pro biolistickou transformaci běžně používané na urychlení mikročástic potažených DNA pro přímé vnesení do rostlinných buněk. Starší metoda využívá zrychlený nosič (macrocarrier) nesoucí mikročástice potažené požadovanou DNA. Novější metodou je metoda mikroprojektilového přenosu DNA, jejímž principem je vstřelování DNA pomocí genového děla (*Gray a kol., 1994; Šmídková a kol., 2010*). U této metody se DNA nastřeluje do rostlinné tkáně, kde je na nosičích navázána na mikročástice zlata nebo wolframu za přetlaku helia. Pro nastřelování mikročástic jsem používala zařízení BioRad Helios Gun (*Šmídková a kol., 2010*), viz Obr. 2.

Při této metodě se k vnášené DNA buňka chová jako ke dvouvláknovým zlomům, opravovaným nehomologním spojováním konců (dále jen NHEJ). Nicméně, pokud vnášená dvouvláknová DNA obsahuje sekvence homologní s genomovou DNA, dochází k párování a rekombinaci (HR) vnášené DNA se stávající genomovou. Takto je možné využít pro cílenou mutagenesi vnášení DNA, s částečnými, nebo úplnými homologními sekvencemi cílové oblasti. Pomocí NHEJ se mohou náhodně integrovat konstrukty, které homologie nemají (*Berezikov a kol., 2004; Šmídková a kol., 2010*).

Mezi výhody biolistické transformace patří především rychlý, jednoduchý a přímočarý postup, který usnadňuje přímou transformaci totipotentních tkání, jako pyl,

embrya, meristémy a morfogenní buněčné struktury. Biolistická transformace je navíc jediná vhodná pro transformaci organel (Sanford, 1988). Nevýhodou je pak vysoká míra transientní exprese a častý výskyt umlčení genu. V některých laboratořích se tento problém často obchází snižováním množství DNA přidávané do mikročástic nebo upravením DNA do lineárních kazet (Fu a kol., 2000).



Obr. 2.: Nastřelování tkáně mechu *P. patens* pomocí BioRad systému „Helios Gene Gun“

2.6. Oprava DNA

V živých organismech se vyvinuly mechanismy, kterými je poškození genomové DNA opraveno, odstraněno nebo tolerováno. Obecně se označují reparací DNA a rozumí se jimi enzymatická oprava poškození DNA, které vzniklo během replikace, rekombinace nebo působením vnějších vlivů a narušuje strukturu DNA tak, že nemůže sloužit jako templát replikace. Mezi poškození DNase počítá především přerušení fosfodiesterové vazby mezi dvěma sousedními nukleotidy, tzv. zlomy v DNA.

Pokud k tomuto přerušení dojde pouze v jednom vlákně dvoušroubovice, vzniká jednovláknový zlom DNA (dále jen SSB) a druhý řetězec DNA zůstává

zachován. Pokud je ovšem přerušen i druhý řetězec na stejném místě nebo blízko prvního zlomu, dochází k dvouvláknovým zlomům (dále jen DSB). Dalším typem poškození DNA je tvorba různých aduktů s externě působícími genotoxiny, vznik dimerů, chybné párování bází apod (*Rosypal, 2000*).

2.6.1. Oprava DSB v DNA

DSB vznikají během replikace, mitotické a meiotické rekombinace a V(D)J rekombinace. Mohou být generovány chemickým a fyzikálním poškozením způsobeným ionizujícím zářením, genotoxickými chemickými látkami a vedlejšími produkty metabolismu - kyslíkovými radikály (*Hopfner a kol., 2001; Lamarche a kol., 2010*). DSB se liší od všech ostatních typů poškození tím, že informace o sekvenci nezbytná pro provedení opravy není přítomná v duplexní molekule DNA. Patří tak mezi nejrozsáhlejší poškození DNA, která mohou být příčinou chromozomálních translokací, aneuploidie a zvýšeného výskytu malignity. Oprava DSB je poměrně dobře prostudována u kvasinek a savčích buněk. Dosud byly popsány dvě hlavní dráhy pro opravu DSB: HR a NHEJ. U bakterií a jednoduchých eukaryot, jako např. *Saccharomyces cerevisiae*, je hlavním typem opravy dráha HR, zatímco u savčích buněk je více než 90 % DSB opravovaných dráhou NHEJ (*Takata a kol., 1998*). Mechanismus opravy HR a NHEJ se v buňce vzájemně doplňují a každý z nich působí za jiných podmínek. Rozsah, ve kterém jsou tyto dvě dráhy využívány, závisí na řadě faktorů jako: typu buněk, fázi buněčného cyklu ve kterém dochází k poškození DNA, a také se liší mezi jednotlivými organismy (*Lamarche a kol., 2010*).

HR je bezchybným typem opravy, který pro poškozený úsek DNA získává genetickou informaci z nepoškozené alely, např. sesterské chromatidy nebo homologního chromozomu. HR je časově omezena u haploidních organismů pouze na pozdní S – G2 fázi buněčného cyklu, kdy už došlo k replikaci DNA, a tudíž je přítomen homologní templát pro rekombinaci (*Thacker, 1999*).

Proces NHEJ je oproti HR náchylný k tvorbě chyb (error-prone), neboť při opětovném spojování konců DSB využívá omezené nebo vůbec žádné sekvenční homologie. Proto v místě spoje DSB často vznikají různě dlouhé delece popřípadě inserce (*Lieber, 2010*). Při spojování DSB mechanismem NHEJ může dojít i ke ztrátě přesahujících konců v oblasti zlomu, což vede k mutagenitě nebo neúspěšné letální opravě (*Kanaar a kol., 1998*). I přes tyto vlastnosti je NHEJ u eukaryot využíván častěji

než mechanismus HR. Tento paradox je vysvětlován tím, že strukturální integrita chromatinu zajištěná včasným odstaněním DSB je u mnohobuněčných organismů mnohem důležitější než zachování bezchybné sekvence DNA (*Kinner a kol., 2008*). Na rozdíl od HR totiž tento mechanismus probíhá již v G0 a G1 fázi buněčného cyklu (*Takata a kol., 1998*).

Při reparaci DSB pomocí HR i NHEJ hraje významnou roli multifunkční proteinový komplex MRN složený z proteinů MRE11 (angl. Meiotic REcombination 11), RAD50 (angl. RADiation sensitivity) a NBS1 (angl. Nijmegen Breakage Syndrome 1), který se podílí se na detekci a signalizaci DSB a následném spouštění buď reparační DNA nebo buněčné apoptózy a v neposlední řadě i na ochraně a udržování délky telomer (*Lamarche a kol., 2010; Moncalian a kol., 2004*).

Za normálních okolností je přítomnost MRN komplexu prvním krokem, který nastane v místě DSB. Tvorba MRN komplexu napomáhá zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě prostřednictvím interakce s kinázou ATM (z angl. Ataxia telangiectasia mutated) a ATR (z angl. Ataxia telangiectasia Rad3 related) a katalytické podjednotky DNA ProteinKinasy (DNA-PKcs). Tyto proteiny aktivují fosforylační další molekuly potřebné pro zahájení kaskády procesů vedoucích k opravě DSB pomocí NHEJ i pomocí HR (*Kamisugi a kol., 2012*).

2.6.2. Excizní opravy DNA

Pro opravy poškození jednoho vlákna dvoušroubovice DNA existuje řada excizních mechanismů, které odstraňují adukty DNA a poškozené nukleotidy a nahrazují je nukleotidy nepoškozenými, komplementárními s párovým řetězcem DNA. Těmito mechanismy jsou BER a NER (*Rosypal, 2000, Sinha a Häder, 2002*).

NER je ze všech typů oprav DNA nejvšestrannějším mechanismem. Tento systém má schopnost rozpoznat velmi široké spektrum různých strukturálně odlišných, většinou rozsáhlých poškození DNA a ve všech organizmech funguje na základě stejných principů. NER po rozpoznání poškození odstraňuje objemné DNA adukty, které narušují pravidelnou strukturu dvoušroubovice. DNA adukty vznikají působením mnohých genotoxinů jako alkylačních činidel nebo v důsledku expozice ionizujícího a UV záření. Jedná se o vysoce konzervativní reparační dráhu, která zahrnuje okolo 30 různých proteinů (*Friedberg, 2011, Sinha a Häder, 2002*).

BER pomáhá chránit buňky před škodlivými účinky endogenního poškození DNA indukované hydrolýzou, reaktivními kyslíkovými radikály nebo jinými intracelulárními metabolity, které modifikují základní strukturu DNA. Kromě toho BER představuje mechanismus, kterým buňky odstraňují modifikované báze (vzniklé např. působením alkylačních látek nebo některými typy záření), dále apurinní a apyrimidinová místa (dále jen AP) a SSB (Holá *et al.*, 2013).

2.6.3. Fotoreaktivace

Oprava DNA pomocí fotoreaktivace spočívá ve štěpení pyrimidinových dimerů fotolýzou, která se aktivuje viditelným světlem o vlnové délce 340 – 400 nm. Působí specificky a závisí přímo na vlnové délce světla. Z principu působení nedochází ke vzniku chyb při opravě DNA (Rosypal, 2000).

2.7. RNA interference

RNA interference (RNAi) je biologický proces, při kterém nekódující RNA molekuly interferují (párují se) s cílovými úseky mRNA, což vede k částečné, či úplné degradaci transkriptu RNA s následkem omezení, popř. úplnému zabránění exprese genu. Vzhledem ke své specifčnosti a účinnosti je RNAi považována za důležitý nástroj pro studium funkční genomiky, kdy jsou konkrétní geny cíleně vyřazovány (Agrawal *a kol.*, 2003).

Ne vždy je ale možné funkci genů po jejich vyřazení studovat. Bez některých tzv. esenciálních genů není rostlina schopna přežít. Naopak u některých genů nemusí ani po vyřazení dojít ke vzniku pozorovatelného fenotypu, protože jejich funkci zastoupí příbuzné geny. Pokud chceme takové geny studovat, můžeme k tomu v obou těchto případech využít utlumování genů pomocí (RNAi), kdy interference byla úspěšně využita k utlumení jednotlivých genů nebo genových rodin u řady organismů, včetně rostlin (Bonoli *a kol.*, 2006; Mahmood-ur-Rahman *a kol.*, 2008) a její funkčnost byla prokázána i u *P. patens* (Bezanilla *a kol.*, 2003). Mechanismus RNAi reguluje geny buď transkripčním nebo posttranskripčním umlčováním. Klíčovou úlohu v této regulaci hrají krátké nekódující RNA, které mohou mít exonenní nebo endogenní původ a podle způsobu vzniku je dělíme na dvě hlavní skupiny – malé interferující RNA (siRNA) a mikroRNA (miRNA). siRNA vznikají z dlouhých dvouvláknových RNA, zatímco miRNA jsou syntetizovány z krátkých vlásenkových struktur. SiRNA

a miRNA kontrolují expresi cílové RNA navázáním do místa kde jsou k ní komplementární. mRNA s navázanou siRNA či miRNA je pak rozštěpena a degradována, nebo je u ní inhibována translace (*Mahmood-ur-Rahman a kol., 2008*). Pro ztlumování zájmových genů u rostlin se většinou využívají konstrukty, které pod jedním promotorem nesou sekvenci RNA v přímé a inverzní orientaci, takže tvoří inverzní repetice, mezi které se vkládá DNA sekvence, která je odděluje – např. intron. Při transkripci z tohoto konstruktů pak vzniká vlásenková RNA (hpRNA), která je rozštěpena na krátké RNA interferující s mRNA vybraného genu (*Mansoor a kol., 2006*). RNAi může být vysoce specifická, pokud je pro konstrukci hpRNA využita unikátní oblast genu, nebo naopak – mRNA je umlčena i v případě, že je s hpRNA shodná jen z 90%, což umožňuje umlčovat různé sekvencně podobné geny, např. členy genových rodin (*Bezanilla a kol., 2005*). Úroveň tlumení funkce genu může být různá, což umožňuje analýzu funkce esenciálních genů, navíc je možné ovlivňovat produkci hpRNA použitím inducibilního promotoru. Do jednoho konstruktů je navíc možné klonovat vedle sebe i RNA sekvence nepříbuzných genů a jedním konstruktem tak umlčovat více různých genů najednou (*Bezanilla a kol., 2005*).

2.8. Konstrukce transformačních vektorů

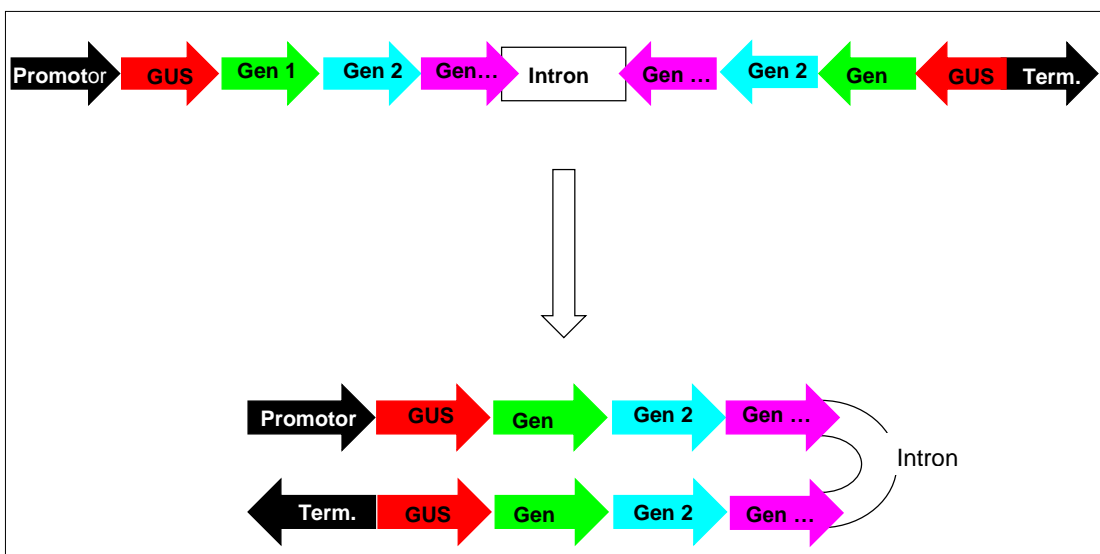
Klonováním DNA (klonování genů, molekulární klonování) se označuje proces, který slouží k vytváření souborů identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA, připravených např. pomnožením rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (*in vivo*) nebo polymerázovou řetězovou reakcí (dále jen PCR) *in vitro*. Jako rekombinantní molekula DNA se označuje molekula DNA vytvořená *in vitro* spojením úseků DNA různého původu. Klonovacím vektorem (přenašečem) je molekula DNA, která má schopnost přijmout cizorodou DNA, spojit se s ní a autonomně se replikovat v hostitelské buňce. Cizorodou DNA je jakýkoli úsek DNA vložený do klonovacího vektoru. Jelikož se cizorodá DNA vkládá do klonovacího vektoru za účelem jeho klonování, označuje se též jako klonovaná DNA nebo jako inzert (*Rosypal a kol., 2002*).

Molekulární klonování patří ke stěžejním metodám molekulární biologie. Umožňuje především izolovat dílčí úseky z komplexního genomu, ty následně namnožit ve formě rekombinantních úseků a zpřístupnit je tak pro další studie. Mezi hlavní oblasti využití klonování lze zařadit především izolaci genů pro studium jejich

funkce a struktury, studium regulačních oblastí, které řídí expresi genů, fyzikální a genetickou analýzu genomů a expresi cizích genů v nepříbuzných hostitelích (*Rosypal a kol., 2002*).

Standardní metody molekulárního klonování jakéhokoliv fragmentu DNA v podstatě zahrnují sedm kroků: 1) Výběr hostitelského organismu a klonovacího vektoru, 2) Příprava vektorové DNA, 3) Příprava DNA pro klonování, 4) Vytvoření rekombinantní DNA, 5) Zavedení rekombinantní DNA do hostitelského organismu, 6) výběr organismů, které obsahují rekombinantní DNA, 7) screening klonů s požadovanými DNA inzerty a biologickými vlastnostmi (*Brown, 2010*).

V rámci diplomové práce jsem se podílela na konstrukci transformačních vektorů pro tvorbu mutant pomocí RNA interferenci. Kontrolním markerem umlčování specifických genů RNA interferencí v konstruovaných vektorech se využívá indikátorového genu β -glukuronidasy (GUS) jehož exprese je snadno vizuálně detekovatelná (Obr. 3).



Obr. 3: Obecný násobný RNAi transformační vektor s RNAi sekvencí indikátorového genu GUS.

2.9. Analýza poškození DNA

Pro studium různých typů poškození DNA bylo vyvinuto mnoho metod pro funkční analýzu DNA. Jmenovat lze např. metodu FISH (Fluorescenční *in situ* hybridizace), kometový test, značení DNA *in vivo*, analýzu pomocí mikročipů a mnoho dalších. V diplomové práci jsem sekvenovala DNA, jež po řadu let patří mezi nejrozšířenější způsoby genetické analýzy (*Stockert a kol., 2014*).

2.9.1. Sekvenování DNA

Cílem sekvenování DNA je určení pořadí nukleotidů v daném fragmentu DNA. Základním požadavkem pro sekvenování DNA je získání fragmentů s přesně definovanými konci, a proto nejčastěji používaným výchozím materiálem pro sekvenování DNA jsou restrikční fragmenty klonované do vhodného klonovacího vektoru nebo fragmenty získané PCR (*Rosypal a kol., 2002*).

Pro sekvenování DNA se používají dvě hlavní metody- enzymová (Sangerova) a chemická (Maxam-Gilbertova) (*Rosypal a kol., 2002, Franca a kol., 2002*). Chemickou metodu sekvenování vyvinuli v roce 1977 Allan Maxam a Walter Gilbert při studiu struktury nukleových kyselin. Je založena na chemické modifikaci DNA a následném štěpení specifických dNTPs (*Maxam a Gilbert, 1977*). V současné době je využívána jen minimálně, především z důvodu vysoké technické náročnosti (*Franca a kol., 2002*). Podstatně častěji se sekvenuje metodou enzymatické polymerace, kterou v roce 1977 objevil a popsal Frederick Sanger. Při této metodě se využívá jednovláknová DNA (primer), která slouží jako vzor (templát) pro syntézu druhého (komplementárního) vlákna (*Sanger, 1977*). Po proběhnutí polymerizační reakce vytvořené produkty zdenaturují a rozdělí se na polyakrylamidovém denaturujícím gelu. Jako primery se obvykle používají krátké oligonukleotidy o délce zhruba 18 bází komplementárních k části molekuly DNA, jejíž sekvence se stanovuje (*Rosypal a kol., 2002*).

Nejnovější variantou enzymové metody je automatické sekvenování DNA, při němž se sekvence odečítá a vyhodnocuje z gelu automaticky (*Rosypal a kol., 2002*). Pro značení nukleotidů se využívají různá fluorescenční barviva, poté jsou nukleotidy detekovány pomocí laseru a následně tříděny v kapiláře naplněné polyakrylamidovým gelem. Tato kapilární elektroforéza s sebou přinesla výrazné zjednodušení a urychlení pracovního postupu (*Franca a kol., 2002*).

3. CÍLE PRÁCE

Hlavní cíl:

- Studium indukovaných mutací u *P. patens* na molekulární úrovni DNA

Dílčí cíle:

- Pěstování *P. patens in vitro*
- Analýza *APT* lokusu indukovaných mutací sekvenováním
- Porovnání indukování mutagenese a schopnosti reparace DNA u jednotlivých linií mutant mechu *P. patens*

4. MATERIÁLY A METODY

4.1. Rostlinný materiál

V práci byl použit divoký typ (Wt) mechu *P. patens* (Hedw.) B.S.G. 'Gransden 2004' a z něj odvozené mutantní linie *ppmre11*, *pprad50*, *pplig4* a *ppku70*. *Pplig4* a *ppku70* s defekty v opravě pomocí NHEJ byly generovány v laboratořích prof. Schaefera, Univ. Neuchâtel, Švýcarsko a Dr. Nogue, INRA, Versailles, Francie, a poskytnuty Dr. Noguem. Jejich podrobná charakteristika teprve bude publikována. Mutantní linie *pprad50* a *ppmre11* byly vytvořeny v laboratoři Dr. Cumminga, CPS, Univ. Leeds, Velká Británie. Jejich charakteristika a metody přípravy jsou popsány v článku *Kamisugi a kol. (2012)*.

4.1.1. Kultivace *P. patens*

4.1.1.1. Kultivace mutantních linií *P. patens* pro dlouhodobé udržování

Před samotnou kultivací mechu byly založeny primární kultury, které později sloužily k odběru tkáně pro pomnožování a zároveň jako záložní konzervy pro případ kontaminace.

Část tkáně byla odebrána sterilní pinzetou a vložena do kultivační skleničky od dětské výživy cca 150 ml (baby-jar) s pevným BCDAT médiem nalitým do zhruba třetiny nádoby. Sklenička je uzavřena plastovým víčkem a oblepena lékárenskou netkanou páskou pro zajištění výměny vzduchu. Následně byly skleničky s kulturou uchovávány v kultivační komoře s denním režimem 16 hodin světla při 22 °C a 8 hodin tmy při 18 °C. Zhruba po měsíci tkáň dostatečně narostlá a bylo možné odebírat části pro další pěstování. Záložní konzervy byly přendány na stinné místo pro pouhé udržování kultury a aby se zabránilo nadměrně rychlému růstu. Takto připravená konzerva vydrží zhruba 1 – 2 roky. Vždy byly udržovány alespoň čtyři záložní konzervy od každé linie mechu.

4.1.1.2. Příprava Petriho misek

Přibližně 30 - 35 ml čerstvě vysterilizovaného BCDAT média o teplotě 50-80 °C bylo nalito do Petriho misek a bylo ponecháno ve FlowBoxu do druhého dne ke

ztuhnutí a „uzrání“ při laboratorní teplotě. Nespotřebované Petriho misky s médiem byly uchovávány v lednici.

4.1.1.3. Příprava celofánových disků

Celofánové disky o průměru 8 cm (Focus, UK) byly vloženy do autoklávovatelné kruhové nádoby tak, aby dosahovaly max. do ¼ výšky nádoby. Následně k nim byla přidána destilovaná voda a před prvním použitím byly alespoň dvakrát až třikrát autoklávovány. Mezi jednotlivými sterilizacemi byla vyměňována voda.

4.1.1.4. Pomnožování *P. patens*

Část tkáně mechu z primární kultury byla odebrána sterilní pinzetou a vložena do zkumavky se sterilním tekutým BCDAT médiem. Následně byla homogenizována pomocí vysokootáčkového nožového homogenizátoru IKA Thorax T25 po dobu 1 – 2 minut při 10 000 rpm. Dvoulilitrové alikvóty suspenze mechu pak byly pipetovány na jednotlivé Petriho misky s pevným BCDAT médiem pokrytým celofánovým diskem. Kultivována byla v kultivační komoře s denním režimem 16 hodin světla při 22 °C a 8 hodin tmy při 18 °C. Zhruba po sedmi dnech byl mech subkultivován/pasážován: – seškrábnut sterilní pinzetou se zahnutým koncem z Petriho misky, homogenizován v tekutém BCDAT médiu a opět vysazen v 2 ml alikvótech na Petriho misky. Jedna Petriho miska s dobře narostlým mechem obvykle vystačila na rozpěstování 4 – 7 Petriho misek.

4.1.1.5. Testování kontaminace

Při každém pasážování byl prováděn test případné kontaminace na Petriho miskách s LB médiem. LB média bylo nalito do Petriho misek zhruba 30 ml a následně bylo ponecháno k zatuhnutí při laboratorní teplotě. Po pasážování bylo na Petriho misku s LB médiem pipetováno zhruba 5 µl suspenze mechu a ponecháno ke kultivaci v inkubátoru při 28 °C. V případě, že se na LB médiu objevila kontaminace (obvykle do dvou dnů), byly mechy zlikvidovány a napěstovány nové.

4.1.2. APT mutageneze

4.1.2.1. Příprava jednodenní suspenze mechu

Na jeden pokus indukce APT mutageneze byla použita jednodenní kultura tkáně protonemy získaná ze sedmi ploten týden staré kultury mechu. Tkáň protonemy byla homogenizována jak bylo popsáno výše v 15 ml tekutého BCDAT média. Suspenze byla přelita do Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml a následně byl doplněn objem na 54 ml. 4 ml byly použity na stanovení množství sušiny, kdy byla suspenze mechu pomocí podtlaku zakoncentrována na filtru ze skleněných vláken a vysušena při 60 °C 1 hodinu. Do druhého dne pak byly filtry ponechány při laboratorní teplotě pro ustálení laboratorní vlhkosti do druhého dne a zváženy. Zbytek suspenze (50 ml) byl do druhého dne ponechán zregenerovat při třepání 100 rpm a pak použit na pokus. Jednodenní suspenzí byla získána vlákna protonemy o délce 3 – 7 buněk, jejichž koncové, apikální buňky jsou schopné se dělit, zhruba 30 – 50 %.

4.1.2.2. Působení genotoxiny

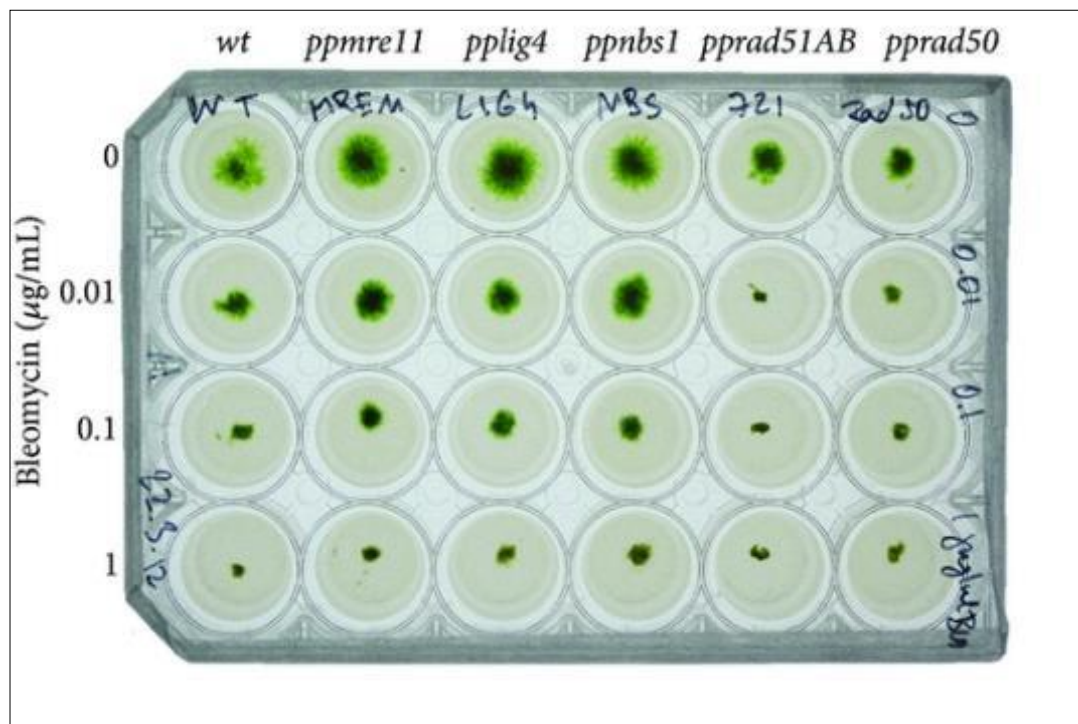
Na indukci poškození byly použity 3 druhy mutagenů: bleomycin (konkrétně byl používán přípravek Bleomedac, v němž je účinnou látkou zastoupen bleomycin sulfát), MMS a UV záření.

Mutageneze UV byla prováděna v pomoci přístroji „Hoefer UV crosslinker“, kdy jednodenní suspenze mechu vysetá na Petriho misky s pevným BCDAT médiem doplněným 3 µg/ml 2-FA pro selekci byla ozářena dávkou UV záření 500 Jm⁻². Petriho misky s ozářeným mechem byly z důvodu blokování fotolyáz ponechány 24 hodin ve tmě a teprve poté kultivovány na světle s denním režimem 16 hodin světla při 22 °C a 8 hodin tmy při 18 °C.

U mutagenezí s mutageny bleomycinu a MMS se mutagen přidal do suspenze 50 ml mechu v Erlenmayerově baňce a nechal akutně působit za stálého třepání 100 rpm. Pro WT byla doba působení 2 hodiny, pro MRN mutanty 1 hodinu. Po působení mutagenem byla suspenze mechu důkladně opláchnuta destilovanou vodou přes sítko, vysazena na Petriho misky s BCDAT médiem doplněným 3 µg/ml 2-FA a kultivována ve fytotronu.

Roztoky pro působení bleomycinem byly vždy připravovány čerstvě před působením z připravených navážek uskladněných v lednici.

Pro určení koncentrace mutagenů bleomycinu a MMS byl testován protonemální růst mechu na jamkových kultivačních deskách s BCDAT médiem doplněným o koncentrační řady mutagenů (viz Obr. 4). Toto testování bylo prováděno vždy v duplikátu a tři týdny sledováno.



Obr. 4: Citlivost *P. patens* Wt a linií *ppmre 11*, *pplig4*, *ppnbs1*, *pprad51AB* a *pprad 50* na chronické působení bleomycinem. Mutantní linie byly kultivovány na BCDAT médiu doplněným o 0; 0,01; 0,1, a 1 µg/ml, bleomycinu a vyfotografované 10 dní po inokulaci.

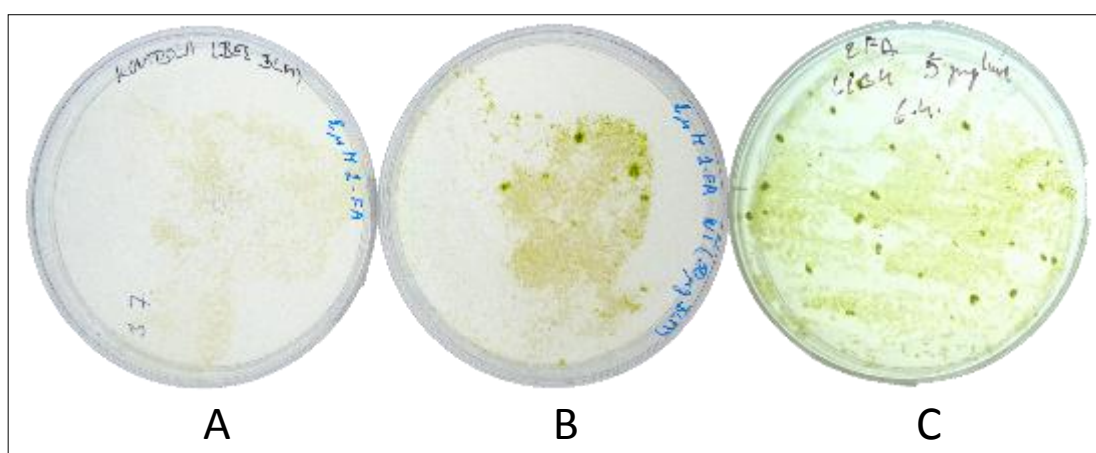
Pro působení bleomycinem byly zvoleny následující koncentrace:

<i>wt</i>	50 µg/ml
<i>pplig4</i>	5 µg/ml
<i>ppmre11</i>	1 µg/ml
<i>ppku70</i>	0,4 µg/ml
<i>pprad 50</i>	0,01 µg/ml

a pro indukci mutací MMS byla zvolena jednotná koncentrace 0,5 mM pro Wt i všechny studované reparační mutanty.

4.1.2.3. Selekcce mutant

Po dobu tří týdnů rostlinná tkáň mechu na Petriho miskách s 2FA postupně odumírá a začínají se objevovat viditelná zelená ohniska (foci) buněk s mutovaným *APT* genem, které jsou rezistentní k působení 2FA, který nejsou schopné metabolizovat (Obr. 5). Celofánové disky s regenerujícími mutanty jsou po 2-3 týdnech přendány na nové Petriho misky s BCDAT médiem doplněným 8 $\mu\text{g/ml}$ 2FA. Po další kultivaci 1-2 týdny jsou zelené kolonie přežívajících mutant spočítány a evidovány. Vybrané přežívající *apt* mutanty, přibližně 10 linie/působení, byly dále pomnoženy a následně sekvenovány podle postupu popsaného v kap. č. 4.2.2.



Obr. 5: Petriho misky s *apt* mutanty *P. pates* rezistentními k 2FA po třech týdnech selekce. A) Wt bez působení mutagenu, B) Wt po působení bleomycinem 50 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 2 h, C) *pplig4* po působení bleomycinem o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 1 h.

4.1.3. Nastřelování a selekcce transformant

Biolistickou transformací byly vnášeny plasmidy s potřebným úsekem genu do kontrolního kmene Wt.

Příprava částic na biolistickou transformaci

Na 12 nábojů bylo naváženo 7,2 mg zlatých částic o průměru 0,6 μm . Následně bylo přidáno 250 μl 96% EtOH a třepáno při 900 rpm po dobu 1 h. Směs částic s EtOH pak byla centrifugována 5 sekund při 13 000 rpm, odsát supernatant a přidáno dalších 250 μl 96% EtOH a vortexováno po dobu 1 minuty. Proces omytí byl zopakován celkem 3x. Na závěr byla suspenze částic v EtOH zcentrifugována 5 sekund při 13 000

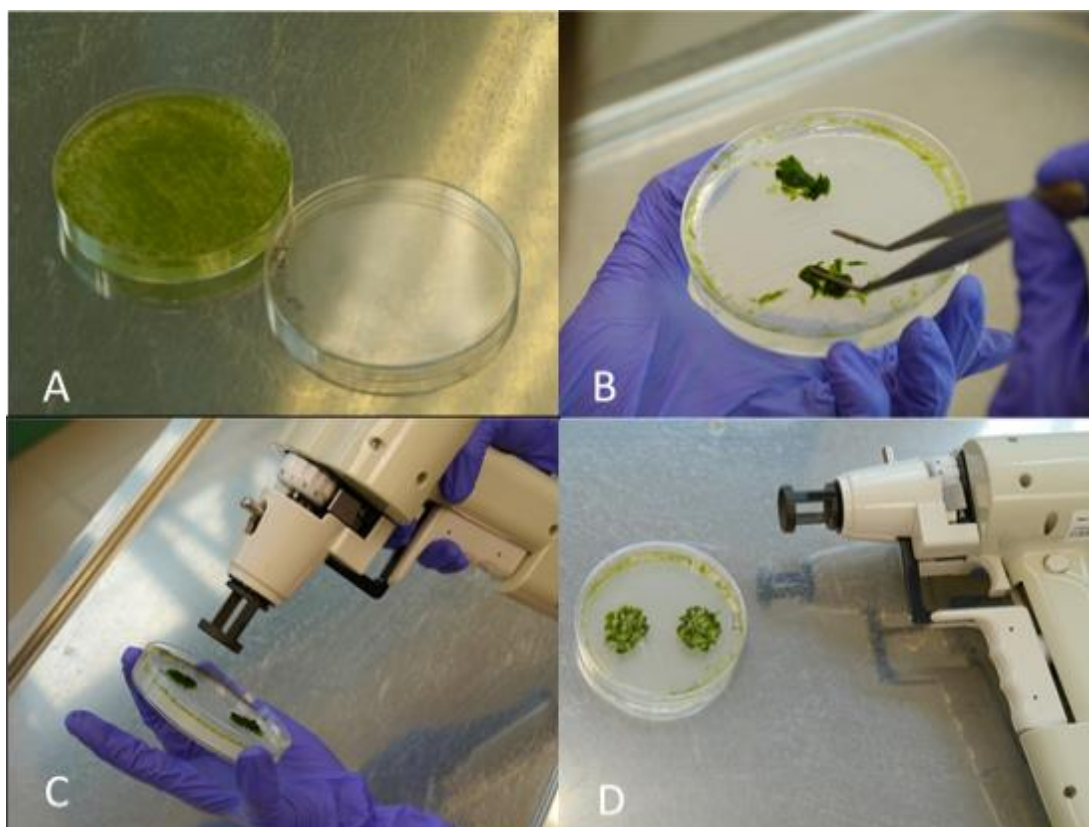
rpm, supernatant odsát a částice suspendovány ve 250 µl sterilní destilované vody vortexováním po dobu 1 minuty. Připravené částice byly uchovávány v mrazicím boxu jako suspenze v 96% EtOH.

Potahování částic DNA

Suspenze částic byla 15 minut sonikována, aby se rozbily shluky částic, a následně suspendována vortexováním po dobu 3 minut. K suspenzi bylo přidáno 30 µl 0,1 M spermidinu a směs vortexována po dobu 1 minuty. Poté byl přidán roztok DNA obsahující celkově 2,4 µg DNA, což odpovídá 0,2 µg/ náboj a vortexováno 1 minutu. Množství DNA v roztoku bylo měřeno spektrofotometricky. Ke směsi bylo přidáno 75 µl 2,5 M CaCl₂, 3 minuty vortexováno a inkubováno na ledu po dobu 5 minut. Směs byla zcentrifugována po dobu 5 sekund při 13 000 rpm, byl odstraněn supernatant, přidáno 350 µl 70% EtOH a vortexováno po dobu 1 minuty. Směs byla zcentrifugována po dobu 5 sekund při 13 000 rpm, byl odstraněn supernatant, přidáno 150 µl 96% EtOH, 3 minuty vortexováno a dále inkubováno na ledu. Následující kroky byly prováděny sterilně ve flowboxu. Do každého náboje bylo naplněno 10 µl směsi, která byla před každým plněním důkladně protřepána pomocí vortexu. Poté se nechal ethanol z nábojů zcela odpařit a DNA potažené částice vytvořily prachový film částic na vnitřní straně dutinky náboje, který pak byl vymeten a akcelerován k rostlinné tkáni uvolněným vysokým tlakem hnacího plynu (helium).

Nastřelení tkáně mechu

Sedm dní stará kultura mechu po předchozí subkultivaci byla na Petriho misce rozdělena na 2 hromádky. Do každé hromádky byly nastřeleny částice ze vzdálenosti cca. 5 cm a 3 nábojů tak, že každou dutinkou se nechal proud vzduchu projít opakovaně 3x. Mech s nastřelenými částicemi byl do druhého ponechán ke zregenerování a pak byl vysazen na BCDAT médium se selekcí na rezistenci nesenou na transformujícím plazmidu (obvykle G418). Postup při nastřelování transformant je znázorněn na Obr.6.



Obr. 6: Postup při nastřelování transformant pomocí biolistické transformace. A) Petriho miska se 7 dní starým mechem, B) Rozdělení mechu na dvě hromádky – cíle nastřelení, C) Nastřelování transformant pomocí „Helios Gene Gun“, D) Petriho miska s hromádkami mechu po nastřelení transformant.

Selekce transformant

Po dobu tří týdnů netransformované buňky mechu na Petriho miskách s G 418 postupně odumíraly, než se začaly objevovat viditelné mutanty rezistentní na G 418. Tyto mutanty byly dále kultivovány po dobu 10 dnů a poté byl celofánový disk s mutanty přendán na novou misku s BCDAT médiem bez selekce. Po 10 dnech byl celofánový disk přendán opět na BCDAT médium se selekcí. Tento postup byl zopakován celkem čtyřikrát a byl aplikován proto, aby byly selektovány pouze mutanty s transformující DNA integrovanou do genomové, a byly tak eliminovány mutanty pouze s transientní expresí selekčního markeru.

4.2. Molekulárně biologické metody

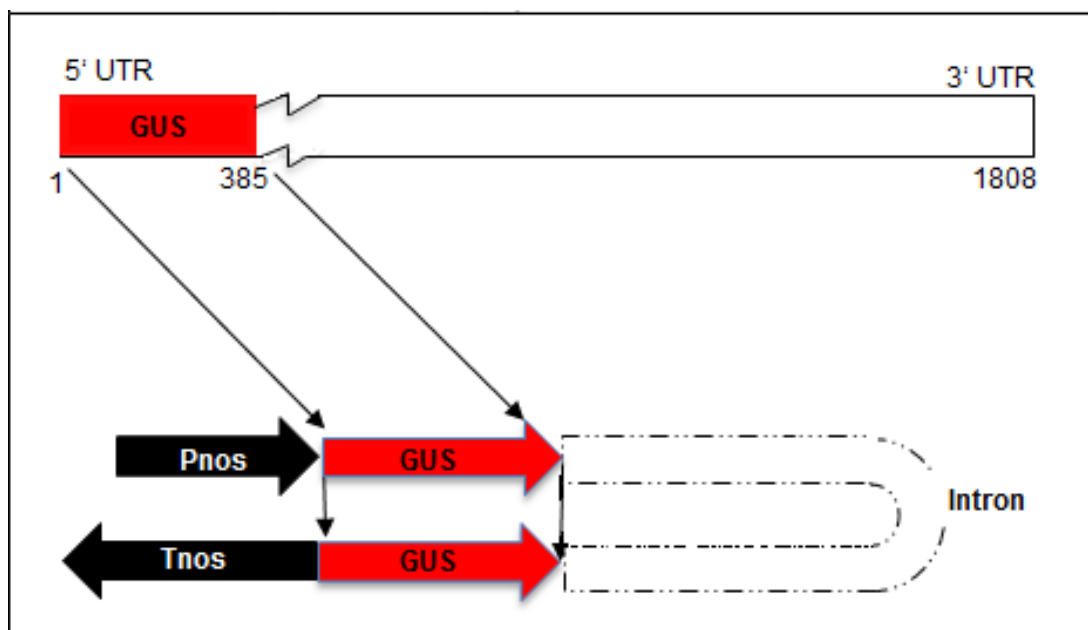
4.2.1. Klonování a konstrukce transformačních vektorů

Součástí mé diplomové práce je příprava vektorů pro tvorbu dalších mutant než těch, které jsem studovala zatlumováním zájmových genů pomocí RNA interference. Na konstrukci a klonování potřebných konstruktů pracuji paralelně se studiem mutagenese, a protože není dosud ukončeno a stále probíhá, není tato část dále zahrnuta do výsledků a diskuze.

Princip konstrukce těchto vektorů je popsán v kapitole 2.7. Pro snadnou identifikaci rostlin obsahujících transformační vektor, který je úspěšně transkribován, je jako vnitřní marker RNA interference využit gen pro β -glukuronidázu (GUS), jehož exprese je snadno vizuálně identifikovaná substrátem X-Gluc jako modré zbarvení buněk. Z tohoto důvodu je nejprve potřeba generovat linii mechu stabilně exprimující GUS, která bude následně využita pro transformace RNAi vektory, který kromě zájmových genů ponese i sekvence pro umlčování GUS (Obr. 3). Kromě histochemického barvení pomocí X-Gluc lze GUS aktivitu kvantitativně stanovit pomocí fluorimetru, a tím pádem odhadnout, zda a do jaké míry dochází pravděpodobně i k utlumení funkce genu, který je předmětem zájmu.

Pro získání rostliny stabilně produkující GUS byl zkonstruován vektor pKA147, který nese gen pro β -glukuronidázu ve fúzi se selekčním genem pro neomycin fosfotransferázu II, který zajišťuje rezistenci na antibiotikum G418. Transkripce těchto genů je řízena 35S promotorem a terminátorem z viru mozaiky květáku (Cauliflower mosaic virus, CaMV).

Pro zatlumování GUS byl zkonstruován vektor pKA217 (Obr. 7), který nese 385 bps dlouhý fragment 5' konce genu pro GUS jednou v přímé a jednou v inverzní orientaci. Mezi tyto dva fragmenty GUS genu je vložen intron kukuřičného genu pro ubiquitin 1 (UBI1). Transkripce je řízena promotorem a terminátorem genu pro nopalín syntázu (P_{NOS} a T_{NOS}) *Agrobacterium tumefaciens*. Mezi intronem a fragmenty GUS genu jsou na každé straně unikátní restrikční místa, do kterých je možné klonovat další DNA pro zatlumování genů, které budou předmětem studií.



Obr. 7: Schéma konstrukce GUS RNAi vektoru

4.2.2. Sekvenování DNA

Genomová DNA *apt* mutant pro analýzu *APT* lokusu a transformant pro analýzu integrace byla izolována ze 100 mg rostlinné tkáně pomocí izolačního „DNeasy Plant Mini kitu“ (Qiagen) do 50 μ l roztoku 10 mM Tris-Cl, pH = 8,5. 1 mikrolitr DNA byl následně použit pro amplifikaci cílové sekvence pomocí PCR. První amplifikací byl získán úsek z genomové DNA pomocí silně procesivní error-free KOD Hot Start DNA polymerázy. Produkt byl přečištěn pomocí purifikačního „HighPure PCR product purification kitu“ (Roche). Následně byla provedena zpřesňující PCR amplifikace použitím další sady vnitřních (nested) primerů. Amplifikovaný fragment DNA očekávané délky byl po analýze elektroforézou izolován přímo z elektroforetického agarózového gelu pomocí „QIAquick gel extraction kitu“ (Qiagen) a použit jako templát pro sekvenační reakce, které byly připraveny pomocí „Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Perkin-Elmer) a na závěr přečištěny na kolonce Sephadexu G25. Sekvence byla přečtena metodou enzymové sekvenace ve středisku sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. pomocí kapilárového analyzátoru Prism 3130x1 (Applied Biosystems, USA). Sekvence každého klonu byly následně spojeny dohromady, zpracovány v programu Ma-cVector a uvedeny do souladu s nejnovější anotovanou *APT* sekvencí

Pp1s114_124V6.1 v databázi zdrojů o *P. patens* COSMOSS (dostupné na www.cosmoss.org).

5. VÝSLEDKY

Moje diplomová práce je věnována studiu mutagenese genotoxinů modelujících environmentální stres na molekulární úrovni za použití modelového organismu mechu *Physcomitrella patens* s cílem ukázat, že mutagenese spíše než vlastní poškození DNA je důvodem citlivého fenotypu. Kromě toho, pokud použitý přístup bude verifikován, může být dále rozvíjen jako biomarker poškození zevního prostředí a mech *P. patens* pro své značné rozšíření přímo jako indikátorový, popřípadě modelový organismus.

Mutace, zejména u haploidních organismů v genech kódujících enzymy nukleotidového metabolismu, jako je APT, způsobují rezistenci rostlin k jinak toxickým analogům adeninu, např. k 2FA. Tato vlastnost byla použita jako pozitivní selekční marker pro identifikaci *apt* mutant. Mutátorový fenotyp byl hodnocený na základě ztráty *APT* genu v důsledku chybných mechanismů opravy poškození DNA (tzv. error-prone) u kontrolního kmene *Wt* a linií *ppmre11*, *pprad50*, *pplig4* a *ppku70*.

Ve všech experimentech byla použita jednodenní protonemální tkáň *P. patens* s fragmenty o délce 3-5 buněk, které byly získány intenzivní homogenizací z rostoucích protonemálních vláken.

5.1. Citlivost *Wt* a testovaných linií *P. patens* na bleomycin, UV záření a MMS

U *Wt* a *ppmre 11*, *pprad 50*, *pplig 4* a *ppku70* linií byla analyzována citlivost k bleomycinu, radiomimetiku způsobujícím klastry oxidativního poškození DNA, tvorbou ROS, UV záření vedoucí k CPD a 6-4 PP, a alkylační činidlo MMS. Na jamkové destičky s BCDAT médiem doplněným o různé koncentrace mutagenů bylo vysazeno vždy stejné množství jednodenních protonemálních tkání *P. patens* a po dobu tří týdnů kultivováno a sledováno. Obr. 4 je fotografie pořízená po 10 dnech kultivace, ze které je u jednotlivých mutantních linií jasně patrná rozdílná citlivost k bleomycinu, naopak na působení MMS, stejně tak jako na UV záření, reagují všechny mutantní linie stejně.

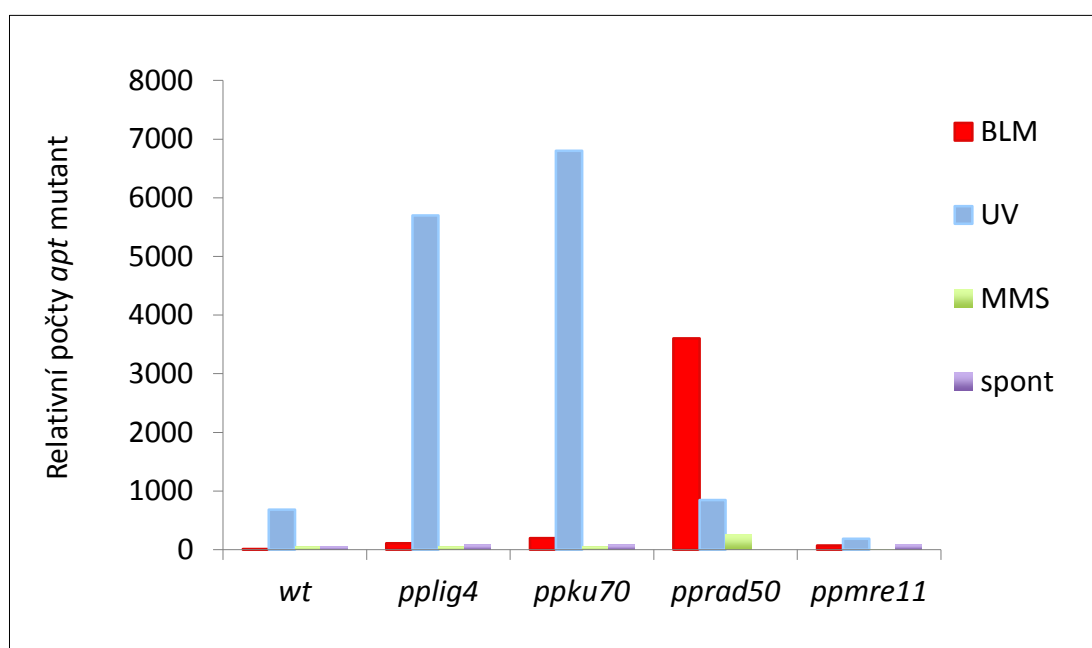
Po působení bleomycinem byly zjištěny dramatické rozdíly indukce mutací. Zatímco divoký kmen Wt vyžaduje pro indukci alespoň několika *apt* klonů na Petriho misce 2 hodiny působení bleomycinem o koncentraci 50 µg/ml, vysoce citlivá linie *pprad50* pouze 1 hodinu působení o koncentraci pouze 0,1 µg/ml.

Ostatní linie mechu *ppmre 11*, *pplig 4* a *ppku70* byly vyhodnoceny jako linie s mírným mutátorovým fenotypem. Pro působení bleomycinem byly na indukci *apt* mutant zvoleny koncentrace 1 µg/ml pro *ppmre 11*, 5 µg/ml pro *pplig4* a 0,4 µg/ml pro *ppku 70*.

Pro působení MMS byla zvolena doba působení 1 hodina a koncentrace 0,5 mM pro Wt i všechny linie *P. patens*. U mutagenese UV zářením byla pro Wt i všechny linie *P. patens* zvolena dávka záření 500 J/m² po dobu nutnou pro dosažení požadované dávky.

5.2. Porovnání testovaných mutantních linií *P. patens* z hlediska přirozených dispozic k mutacím

Pro porovnání frekvence vzniku mutant u Wt a linií *P. patens* byl normalizován počet *apt* mutant na 1 µg/ml po působení bleomycinem, 1 mM po působení MMS a 500 J/m² po působení UV zářením na 1 g sušiny. Hodnoty relativního (normalizovaného) počtu *apt* mutant jsou na Obr. 8.



Obr. 8: Relativní počty 2 FA rezistentních mutant *P. patens* Wt a linií *pplig4*, *ppku70*, *pprad50* a *ppmre11* selektovaných spontánně a mutant indukovaných 1 µg/ml bleomycinu, 1 mM MMS a 500 J/m² UV zářením a normalizované na 1 g sušiny.

5.3. Analýza mutací

Náhodně vybrané *apt* mutanty regenerující na BDAT médiu doplněným o 2FA byly pomnoženy a sekvenovány postupem popsáním v kapitole č. 4.2.2. Výsledky analýzy *APT* mutací a jejich kategorizace jsou uvedeny v Tab. 1.

Identifikované mutace byly podle předpokládaných mechanismů reparace a jejich důsledků klasifikovány jako substituce, bodové inserce, bodové delece a inserce a delece o délce více než dvou párů bazí jednak v kódujících sekvencích *APT* (exonech) ale i v intronech a nepřepisovaných oblastech lokusu *APT*.

U *apt* mutant vzniklých působením bleomycinu byly u Wt i všech mutantních linií *P. patens* zjištěny především tranzice cytosinu za tymin, transverze tyminu za adenin, adeninu za tymin a guaninu za tymin, a to jak v exonech, tak v intronech. Kromě toho u linií *pprad50* a *ppmre11* byly v exonech zjištěny rozsáhlé delece. Vzniku delecí při opravě DSB mechanismem NHEJ vysvětlujeme vysokou citlivost *pprad50* a *ppmre11* k působení bleomycinu.

Po ozáření UV byly téměř u všech analyzovaných mutant zjištěny tranzice cytosinu za tymin, a to pouze v exonech. V ostatních případech se v exonech jednalo o tranzice guaninu za adenin, v intronech byly zjištěny transverze a bodové inserce adeninu.

Po působení MMS sice začalo regenerovat poměrně hodně 2FA rezistentních klonů, které však obvykle do čtrnácti dnů po selekci odumřely. Proto se podařilo v důsledku jejich špatné regenerace analyzovat pouze 3 mutanty u mutantní linie *pplig4*, u které byly zjištěny mutace především v exonech, konkrétně transverze guaninu za thymin, guaninu za cytosin a adeninu za tymin. Pouze v jednom případě se jednalo o bodovou inzerci guaninu v intronu.

Spontánní mutace byly analyzovány pouze u mutantní linie *ppku70*. V prvním případě se jednalo o rozsáhlou delecí 1128 nukleotidů v exonu, ve druhém o tranzici cytosinu za tymin v exonu a ve třetím o transverzi v intronu.

5.4. Rozložení mutací testovaných mutantních linií *P. patens* v *APT* lokusu

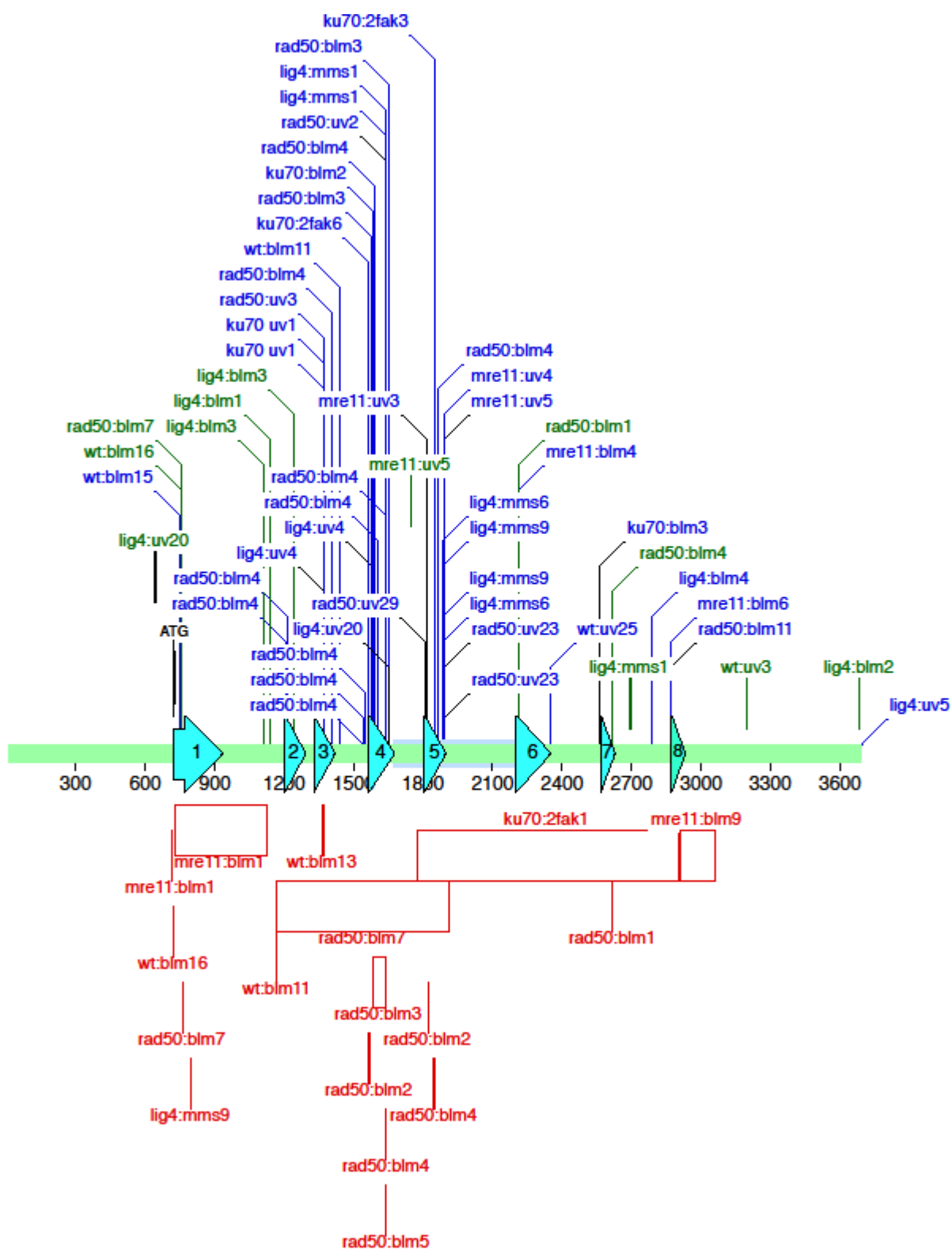
Umístění identifikovaných a popsanych mutací uvedených v Tab. 1 je graficky znázorněno v mapě *APT* lokusu programem Mac Vector na Obr. 9. Modře jsou vyznačeny substituce, zeleně inserce a červeně delece. Delece jsou znázorněny jako

obdélníky o velikosti úměrné délce. Šipky s čísly od 1 do 8 znázorňují délky exonů (kódujících sekvencí DNA) v *APT* lokusu.

Z obrázku je jasně patrné, že mutace nejsou v genu rozmístěné náhodně, nejvíce se vyskytují na začátku genu, a to především v okolí druhého až čtvrtého exonu.

5.5. Konstrukce transformačních RNAi vektorů

Pro ztlumování GUS byl vytvořen GUS RNAi transformační vektor pKA 217 sloužící jako marker RNA interference (Obr. 7). Linie mechu stabilně produkující GUS, která bude využita pro transformaci RNAi vektorem, je vytvářena prostřednictvím biolistické transformace. V současné době se na transformaci linie mechu a na cílené modifikaci genů pomocí RNAi stále pracuje.



Obr. 9. Indukované mutace v *APT* lokusu u *Wt* a linií *ppmre11*, *pprad50*, *pplig4* a *ppku70*. Typy mutací jsou substituce – modré, inserce – zelené a delece – červené.

mutantní linie		INTRONY					EXONY				
	apt mutanty #	substituce	bodové inzerce	bodové delece	inzerce >2	delece >2	substituce	bodové inzerce	bodové delece	inzerce >2	delece >2
wt	<i>blm11</i>	T-->A(1436)		A(1168)							
	<i>blm13</i>										1364:1372
	<i>blm15</i>						T-->A(747)				
	<i>blm16</i>			C(720)				G(752)			
	<i>uv3</i>		A(3199)				C-->T(1369)				
	<i>uv25</i>	G-->T(2351)									
pprad50	<i>blm1</i>							T(2213)			
	<i>blm2</i>			T(1823)							1566:1571
	<i>blm3</i>						A-->T(1577)				1582:1637
	<i>blm4</i>	T-->A(1543) A-->T(1544) G-->T(1546)					A-->T(1204) T-->A(1212) T-->C(1407) T-->A(1591) T-->A(1604) T-->C(1634) C-->T(1869)	G(1640)			
	<i>blm5</i>							G(1640)			
	<i>blm7</i>							G(752)	T(761)		1166:1914
	<i>blm11</i>	G-->A(2872)									
	<i>uv2</i>						C-->T(1635)				
	<i>uv23</i>						C-->T(1894) C-->T(1895)				
	<i>uv29</i>						G-->A(1809)				
ppmre11	<i>blm1</i>			G(715)					T(2619)		739:1125
	<i>blm4</i>						G-->T(2215)				
	<i>blm6</i>	G-->T(2871)									
	<i>blm9</i>					2908-3061					
	<i>uv3</i>						C-->T(1813)				
	<i>uv5</i>						C-->T(1893)				
pplig4	<i>blm1</i>		A(1138)								
	<i>blm2</i>		T(3683)								
	<i>blm3</i>		C(1108)					T(1240)			
	<i>blm4</i>	T-->A(2790)									
	<i>mms1</i>		G(2695)				G-->T(1638)				
	<i>mms6</i>						G-->C(1885) A-->T(1887)				
	<i>mms9</i>						G-->C(1885) A-->T(1887)				
	<i>uv4</i>						C-->T(1369) G-->A(1576)				
	<i>uv5</i>	A-->C(3699) C-->T(3700)					C-->T(1834)				
	<i>uv20</i>		A(643)								
ppku70	<i>blm2</i>						T-->A(1582)				
	<i>blm3</i>	A-->T(2566)									
	<i>uv1</i>						C-->T(1368) C-->T(1369)				
	<i>2fak1</i>										1774-2902
	<i>2fak3</i>						C-->T(1815)				
	<i>2fak6</i>	G-->C(1563)									

Tab. 1: Výsledky sekvenační analýzy APT lokusu u *P. patens* Wt a linií *ppmre11*, *pprad50*, *pplig4* a *ppku70*.

6. DISKUZE

Ve své diplomové práci jsem se zabývala studiem analýzy fenotypu a indukovaných mutací *P. patens* u Wt a linií *ppmre11*, *pprad50*, *pplig4* a *ppku70* na základě ztráty funkce genu pro *APT*. Podílela jsem se především na indukcii *apt* mutantů a následně na jejich analýze sekvenováním. Kromě *APT* mutagenese byla v laboratoři na *P. patens* také studována reparační kinetika SSB, DSB a CPD metodou kometového testu (comet assay), publikované v článcích *Kamisugi a kol. (2012)*, *Holá a kol. (2013)* a *Holá a kol. (2014)*. Oba přístupy spolu s testem na citlivost k působení genotoxinů se vzájemně doplňují a vytváří ucelený obrázek jak buňky dané linie nakládají se vzniklým poškozením a jaké jsou důsledky jeho eliminace. Kometovým testem byl zjišťován vliv vzniklých poškození na integritu genomové DNA a rychlost jejího znovunabytí, sekvenováním pak k jakým změnám v sekvenci DNA při tom došlo.

6.1. Citlivost na působení mutageny

U mechu *P. patens* divokého typu Wt a linií *ppmre11*, *pprad50*, *pplig 4*, *ppku70* a *ppnbs1* byl analyzován fenotyp chronickým působením bleomycinu (Obr.4). Bylo zjištěno, že *pprad 50* a *ppmre11* vykazují stejnou citlivost k bleomycinu, což souhlasí s výsledky *Kamisugi a kol. (2012)*.

Kozák a kol. (2009) dříve ukázali klíčovou roli komplexu SMC5/6 při opravě DSB indukovaných bleomycinem. V této souvislosti proteiny RAD50 mají podobnou strukturální roli v MRN komplexu jako SMC ve struktuře SMC5/6 komplexu (*Murray a kol., 2008*). Oba tyto komplexy tak mohou figurovat při vzájemné stabilizaci, popř. spojování konců dvojláknového zlomu.

6.2. APT mutagenese

6.2.1. Účinnost testovaných mutagenů

Počet 2FA rezistentních *apt* mutantů *P. patens* Wt a linií *pplig4*, *ppku70*, *pprad50* a *ppmre11* po ozáření 500 Jm⁻² jasně poukazují na vysokou mutagenitu UV záření. Podstatná většina mutantů, která po působení UV zářením regenerovala byla následně selektována. Tento jev lze vysvětlit tím, že s pomalou, error-free NER reparační drahou soupeří rychlejší, leč error-prone mechanismus syntézy DNA přes

poškození (v podstatě jde o toleranci a nikoli reparaci) při němž dochází k substitučním tranzicím, tedy poškození, která byla identifikována (Tab. 1, *Holá a kol., 2014*).

Nejvyšší počty *apt* mutant po působení UV zářením byly zaznamenány u linií *pplig4* a *ppku70* a naopak u *Wt* a ostatních linií byly počty *apt* mutant relativně nízké. Poslední výsledky UV mutagenese u linií *pplig4* a *ppku70* vykazují podstatně vyšší počty mutant než dříve publikovaná data *Holá a kol. (2014)*. Nicméně v této práci uváděné 20x vyšší hodnoty (okolo 6000 *apt* mutant/g sušené tkáně) oproti publikovaným nejsou i přes opakování statisticky významné. Tento rozpor je dále studován.

Ve srovnání s UV zářením po působení bleomycinem regenerovalo podstatně méně *apt* mutant, ale jednou selektovány dále přeživaly. Oproti tomu většina *apt* mutantů, která regenerovala v první fázi po působení MMS, během následné kultivace uhynuly, stejně jako spontánní *apt* mutanty, které byly selektovány na 2FA bez působení mutagenu. V tomto případě lze spekulovat o tom, že spontánní nebo MMS mutagenese vede k „měkčím“ mutacím, které dovolují počáteční selekci na 2FA, ale během následné kultivace dochází k znovuoobnovení funkce *APT*, a tudíž k eliminaci původně rezistentního klonu. Nabízí se však i vysvětlení, že kromě *apt* mutace dochází i k částečné inaktivaci některého(ých) esenciálního(ých) genu(ů), která je v průběhu následné kultivace prohlubována a rostlina není dále schopná přežít přestože je stále rezistentní k 2FA. I tento jev je dále studován.

O specifické mutagenitě UV záření svědčí i nutnost selekce *apt* mutant na vyšší koncentraci 2FA. Po působení genotoxiny byla protonemální tkáň mechu vysazena nejdříve na 3 $\mu\text{g/ml}$ 2FA a po dobu selekce mutant byla koncentrace 2FA postupně zvyšována na koncentraci 5 až 10 $\mu\text{g/ml}$. Zatímco *apt* mutanty po působení bleomycinem, MMS a spontánní *apt* mutanty byly většinou selektovány na koncentraci 3 až 5 $\mu\text{g/ml}$ 2FA. Mutanty indukované UV zářením regenerovaly podstatně lépe a při selekci 3 až 5 $\mu\text{g/ml}$ 2FA přerůstají. Proto je v průběhu selekce, přibližně po 2 týdnech potřeba zvýšit koncentraci 2FA na 8 až 10 $\mu\text{g/ml}$. Zda potřeba zvýšeného selekčního tlaku v případě téměř výlučně generovaných substitučních tranzicí UV světlem je jejich specifickou vlastností, je také dále studováno.

6.2.2. Analýza mutací

Během analýzy mutant sekvenováním byly v závislosti na typech mutagenů i na liniích mutant mechu zjištěny velmi rozdílné typy mutací (Tab. 1). Zatímco UV záření vedlo téměř výlučně k tranzicím thyminu na cytosin v kódujících sekvencích, mutační profil bleomycinu byl zcela jiný.

Dle Holé a kol. (2013) a Kamisugi a kol. (2012) *P. patens* Wt i linie *ppmre11*, *pprad50*, *pplig4* a *ppku70* efektivně opravují dvouvláknové zlomy DNA způsobené bleomycinem ve dvou fázích. Opravy u *pprad50* a *ppmre 11* jsou méně účinné v průběhu druhé, pomalejší, fáze než u Wt, *ppku70* a *pplig4*. Během první, rychlejší, fáze se u *ppmre11* a *pprad50* více než 60% DSBs opravilo již během 3 minut, ale je nutné si uvědomit, že oprava s největší pravděpodobností probíhala pomocí NHEJ, mechanismu velmi náchylného k chybám. Naproti tomu reparační kinetika u *ppnbs1* a linií s defekty v opravě pomocí NHEJ - *pplig4* a *ppku70* byla srovnatelná s Wt (Kamisugi a kol., 2012; Holá a kol., 2013; Holá a kol., 2014). Tato skutečnost by mohla vysvětlovat i rozsáhlé delece po působení bleomycinem, které byly zjištěny právě u *ppmre11* a *pprad50*. Je nutné ovšem uvážit i možnost, že se DSB mohly opravit i méně častými, ovšem stejně nepřesnými nehomologními mechanismy – alternativním spojováním konců (Alt-NHEJ, angl. alternative nonhomologous end-joining), nebo mikrohomologií zprostředkovaným spojováním konců (MMEJ, angl. micro-homology mediated end-joining).

Dle Kamisugi a kol. (2012) rychlost opravy navíc úzce souvisí s věkem protonemální tkáně. Protonemální tkáň, která byla homogenizována a subkultivována pouze 1 den, byla tvořena většinou krátkými filamenti o délce 3-5 buněk a vykazovala nejrychlejší reparační kinetiku. 7 dní stará tkáň protonemy s filamenti 15-20 buněk opravovala DSB pomaleji a rychlost opravy u 14 denní tkáně s délkou fragmentů více než 30 buněk byla ještě pomalejší (Kamisugi a kol., 2012).

Při analýze mutant indukovaných UV zářením byly zjištěny především tranzice, které spíše než možnými chybami při opravě DNA pomocí NER mohly vzniknout mutací během tolerance CPD při *de novo* syntéze přes toto poškození, kdy je přednostně oproti poškození inzertován adenin. Při indukci mutací látkami, které blokují syntézu DNA, jako jsou např. CPD, je nutné, aby byl opravný mechanismus schopen obejít léze tak, že buňka zůstane životaschopná, i když tato léze není odstraněna. Syntéza DNA přes poškození (translesion DNA synthesis) zahrnuje dva

kroky: přidání nukleotidu oproti poškozené bázi, preferenčně adeninu, a následné syntéze po nepoškozeném templátu DNA. Syntéza DNA *de novo* není doprovázena odstraněním CPD, a proto je lépe hovořit o toleranci poškození, které v DNA zůstává, než o reparaci. Vřazení nekomplementárního nukleotidu vede k substitucím, které v případě CPD nebo 6-4PP vřazením adeninu oproti pyrimidinu C vede k pozorovaným tranzicím, viz Tab. 1 (Holá a kol., 2014; Stallons a Mc Gregor, 2010).

Z obr. 9 je zjevné, že rozložení identifikovaných mutací testovaných linií *P. patens* v *APT* lokusu není rovnoměrné. Bylo zjištěno, že se mutace nacházejí převážně v okolí druhého až čtvrtého exonu. Tuto skutečnost se dosud nepodařilo objasnit a tyto oblasti byly vyhodnoceny jako „hot spots“ – místa v genomu, ve kterých k mutacím obecně dochází častěji.

7. ZÁVĚR

Experimenty využívající metody kometového testu a sekvenační analýzy byly prováděny za účelem sledování genotoxických účinků bleomycinu, MMS a UV záření na *P. patens* Wt a linie *ppmre11*, *pprad50*, *pplig4* a *ppku70*. Pro komplexní analýzu genotoxického stresu byla využívána regenerující jednodenní protonemální tkáň *P. patens*.

Metodou kometového testu byla analyzována reparační kinetika DSB *P. patens* Wt a linií mutant akutním působením bleomycinu. Dospělo se k závěru, že DSB jsou efektivně opravovány ve dvou fázích. Oprava DSB u *pprad 50* a *ppmre 11* je méně účinná v průběhu druhé, pomalejší fáze než u WT, *ppku70* a *pplig4*.

Při analýze fenotypu *P. patens* Wt a linií mutant chronickým působením bleomycinu bylo zjištěno, že citlivost k bleomycinu u *pprad 50* a *ppmre11* je o jeden řád vyšší než u linií *ppku70* a *pplig4* a o dva řády vyšší než u Wt.

Sekvenační analýzou *apt* mutant po působení bleomycinem byly výhradně u *pprad50* a *ppmre11* zjištěny rozsáhlé delece, u WT, *pplig4* a *ppku70* se jednalo především o bodové mutace: bodové delece nebo delece pouze malého počtu nukleotidů, inserce, tranzice a transverze. UV záření vedlo u všech analyzovaných mutant téměř výlučně k tranzicím cytosinu na tyminu, a to pouze v exonech. Spontánních *apt* mutant selektovaných na 2FA a *apt* mutant po působení MMS se v důsledku jejich špatné regenerace nepodařilo pro sekvenační analýzu získat statisticky významný počet.

Rozložení identifikovaných mutací u *P. patens* Wt a testovaných linií není v *APT* náhodné. Mutace se vyskytují převážně v okolí druhého až čtvrtého exonu a tyto oblasti byly vyhodnoceny jako „hot spots“.

8. VLASTNÍ PUBLIKACE

HOLÁ M., KOZÁK J., VÁGNEROVÁ R. a ANGELIS K. J., 2013: Genotoxin Induced Mutagenesis in the Model Plant *Physcomitrella patens*. Biomed Research International, ID 535049, 7 s.

HOLÁ M., VÁGNEROVÁ R. a ANGELIS K. J., 2014: Mutagenesis during plant responses to UVB radiation. *Plant Physiology and Biochemistry* 1-5.

FOJTOVÁ M., SÝKOROVÁ E., NAJDEKROVÁ L., POLANSKÁ P., ZACHOVÁ D., VÁGNEROVÁ R., ANGELIS K. J., FAJKUS J., 2015: Telomere dynamics in the lower plant *Physcomitrella patens*. *Plant molecular biology* 87: 591-601.

9. SEZNAM LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ

ABEL W. O., KNEBEL W., KOOP H. U., MARIENFELD J. R., QUADER H., RESKI R., SCHNEPF E. a SPÖRLEIN B., 1989: A cytokinin-sensitive mutant of the moss, *Physcomitrella patens*, defective in chloroplast division. *Protoplasma* 152: 1–13.

ALBERTS B. a kol., 2004: *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*, Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, 630 s.

AMES B. N., 1984: Charles S. Mott prize. The detection of environmental mutagens and potential carcinogens. *American Cancer Society* 53: 2034-2040.

AGRAWAL N., DASARADHI P. V. N., MOHMMED A., MALHOTRA P., BHATNAGAR R. K., MUKHERJEE S. K., 2003: RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 657-685

ASHTON N. V. a COVE D. J., 1977: The isolation and preliminary characterization of auxotrophic and analogue resistant mutants in the moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics* 154: 87–95.

ASHTON N. V., GRIMSLEY N. H. a COVE D. J., 1979: Analysis of gametophytic development in the moss *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* 144: 427–435.

BEREZIKOV E., BARGMANN C. I. a PLASTERK R. H., 2004: Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation. *Nucleic Acids Research* 32: 77-86.

BEZANILLA, M., 2003: RNA Interference in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant physiology* 133: 470-474.

BEZANILLA, M., PERROUD P.-F., PAN A., KLUEH P. a QUATRANO R. S., 2005: An RNAi system in *Physcomitrella patens* with an internal marker for silencing allows for rapid identification of loss of function phenotypes. *Plant Biology* 7: 251-257.

BRANIŠ M., 2004: Základy ekologie a ochrany životního prostředí, 3. aktualizované vydání. Informatorium, Praha, 204 s.

BROWN T., 2006: Gene cloning and DNA analysis: an introduction, 5. vydání, Blackwell Publishing Professional, Cambridge, 386 s.

BONOLI, M., GRAZIOLA M., POGGI V. a HOCHKOEPLER A., 2006: RNA complementary to the 5' UTR of mRNA triggers effective silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Research Communications 339: 1224-1231.

COVE D. J., PERROUD P. F., CHARRON A. J., Mc DANIEL S. F., KHANDELWAL A. a QUATRANO R. S., 2009: The moss *Physcomitrella patens*: A novel model system for plant development and genomic studies. Cold Spring Harbor Protocols 2009 (2): pdb.emo115.

COVE D. J., KNIGHT C. D. a LAMPARTER T., 1997: Mosses as model systems. Trends in Plant Science 2: 99–105.

CROTHER T. R. a TAYLOR M. W., 1998: Site directed mutagenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* APT1 gene. A functional and enzymatic analysis. Advances in Experimental Medicine and Biology 431: 299-303.

FRANÇA L. T. C., CARRILHO E. a KIST T. B. L., 2002: A review of DNA sequencing techniques. Quarterly Reviews of Biophysics 35: 169-200.

FRIEDBERG E. C., 2011: Nucleotide excision repair of DNA: The very early history. DNA Repair 10: 668– 672.

FU X., DUC L. T., FONTANA S., BONG B. B., TINJUANGJUN P., SUDHAKAR D., TWYMAN R. M., CHRISTOU P. a KOHLI A., 2000: Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. Transgenic research 9: 11–19.

GRAY D. J., HIEBERT E., LIN C. M., COMPTON M. E., MCCOLLEY D. W., HARRISON R. J. a GABA V. P., 1994: Simplified construction and performance of a device for particle bombardment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37: 179-184.

HOHE A., EGENER T., LUCHT J. M., HOLTORF H., REINHARD C., SCHWEEN G. A RESKI R., 2004: An improved and highly standardised transformation procedure allows efficient production of single and multiple targeted gene-knockouts in a moss, *Physcomitrella patens*. Current Genetics 44: 339–347.

HOLÁ M., KOZÁK J., VÁGNEROVÁ R. a ANGELIS K. J., 2013: Genotoxin Induced Mutagenesis in the Model Plant *Physcomitrella patens*. Biomed Research International, ID 535049, 7 s.

HOLÁ M., VÁGNEROVÁ R. a ANGELIS K. J., 2014: Mutagenesis during plant responses to UVB radiation. Plant Physiology and Biochemistry -5.

HOPFNER K. P., KARCHER A., CRAIG L., WOO T. T., CARNEY J. P. a TAINER J. A., 2001: Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 105: 473-485.

JANDER G., NORRIS S. R., ROUNSLEY S. D., BUSH D. F., LEVIN I. M. a LAST R. L., 2002: Arabidopsis map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiology* 129: 440-450.

KAMISUGI Y., SCHAEFER D. G., KOZAK J., CHARLOT F., VRIELYNCK N., HOLÁ M., ANGELIS K. J., CUMING A. C. a NOGUE F., 2012: MRE11 and RAD50, but not NBS1, are essential for gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research* 40: 3496–3510.

KANAAR R., HOEIJMAKERS J. H. J. a van GENT D. C., 1998: Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends in Cell Biology* 8: 483-489.

KAWAI S., HASHIMOTO W. a MURATA K., 2010: Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Bioengineered bugs* 1: 395–403.

KINNER A., WU W., STAUDT C. a ILIAKIS G., 2008. γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research* 36: 5678-5694.

KOZÁK J., WEST C. E., WHITE C., da COSTA-NUNES J. A. a ANGELIS K. J., 2009: “Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis thaliana* is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance,” *DNA Repair* 8: 413–419.

KODYM A. a AFZA R., 2003: Physical and chemical mutagenesis. *Methods in Molecular Biology* 236: 189-204.

KROUPA M. a ŘÍHA M., 2010: Průmyslové havárie. Armex publishing s.r.o., Praha, 154 s.

LAMARCHE B. J., ORAZIO N. I. a WEITZMAN M. D., 2010: The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Letters* 584: 3682–3695

LEWIS T. G a NYDORF E. D., 2006: Intralesional bleomycin for warts: a review. *Journal of Drugs in Dermatology* 5: 499–504.

LIEBER M. R., 2010: The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry* 79: 181-211.

LUNDIN C., NORTH M., ERIXON K., WALTERS K., JENSSEN D., GOLDMAN A. S. H. a HELLEDAY T., 2005: Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* 33: 3799–3811.

MAHMOOD-ur-RAHMAN, ALI I., HUSNAIN T. a RIAZUDDIN S., 2008: RNA interference: The story of gene silencing in plants and humans. *Biotechnology Advances* 26: 202-209.

MANSOOR, S., AMIN I., HUSSAIN M., ZAFAR Y. a BRIDDON R.W., 2006: Engineering novel traits in plants through RNA interference. *Trends in Plant Science* 11: 559-565.

MAXAM A. M. a GILBERT W., 1977: A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 560–564.

MEDAC, 2015: Souhrn údajů o přípravku, Praha, online: file:///C:/Users/Uzivatel/Downloads/44-298-11-c-spc-cz-bleomedac-15000iu-30000iu-nl-h-1792-001.pdf, cit. 15. 1. 2015

MONCALIAN G., LENGSELD B., BHASKARA V., HOPFNER K. P., KARCHER A., ALDEN E., TAINER J. A. a PAUL T. T., 2004: The rad50 signature motif: essential to ATP binding and biological function. *Journal of Molecular Biology* 335: 937-951.

MURRAY J. M. a CARR A. M., 2008: Smc 5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 177–182.

PAPAVRAMIDOU N., PAPAVRAMIDIS T. a DEMETRIOU T., 2010: Ancient Greek and Greco-Roman Methods in Modern Surgical Treatment of Cancer. *Annals of Surgical Oncology* 17: 665–667.

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

RESKI R., 1998: *Physcomitrella* and *Arabidopsis*: the David and Goliath of reverse genetics. *Trends in Plant Science* 3: 209–210.

ROSYPAL S., 2000: Úvod do molekulární biologie: Díl třetí. Molekulární biologie virů, mutageneze, kancerogeneze a rekombinace. Opravy poškozené DNA. Stanislav Rosypal, Brno, s. 604-900.

ROSYPAL S., DOŠKAŘ J., PETRZIK K. a RŮŽIČKOVÁ V., 2002: Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie, Stanislav Rosypal, Brno, s. 904 – 1200.

SANFORD J. C., 1988: The biolistic process. *Trends in Biotechnology*. 6: 299-302.

SANGER F., NICKLEN S. a COULSON A. R., 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463-5467.

SCHAEFER D. G. a ZRÝD J-P., 2001: The Moss *Physcomitrella patens*, Now and Then. *Plant physiology* 127: 1430- 1438.

SINHA P. a HÄDER D. - P., 2002: UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences* 1: 225–236.

SOLTIS D. E a SOLTIS P. S., 1999: Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in ecology & evolution* 14: 348–352.

STALLONS L. J. a Mc GREGOR W. G., 2010: Translesion Synthesis Polymerases in the Prevention and Promotion of Carcinogenesis. *Journal of Nucleic Acids*, ID 643857, 10 s.

STOCKERT J. C., ESPADA J. a BLÁZQUEZ-CASTRO A., 2014: Functional Analysis of DNA and Chromatin. *Methods in Molecular Biology* 15: 2469–2470.

ŠMÍDKOVÁ M., HOLÁ M. a ANGELIS. K. J., 2010: Efficient biolistic transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Biologia Plantarum* 54: 777-780.

TAKATA M., SASAKI M. S., SONODA E., MORRISON C., HASHIMOTO M., UTSUMI H., YAMAGUCHI-IWAI Y., SHINOHARA A. a TAKEDA S., 1998: Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal*. 17: 5497 – 5508.

THACKER J., 1999: A surfeit of RAD51-like genes?. *Trends in Genetics* 15: 166-168.

TROUILLER B., SCHAEFER D. G, CHARLOT F. a NOGUÉ F., 2006: MSH2 is essential for the preservation of genome integrity and prevents homeologous recombination in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic acids research* 34: 232-242.

TROUILLER B., CHARLOT F., CHOINARD S., SCHAEFER D. G a NOGUÉ F., 2007: Comparison of gene targeting efficiencies in two mosses suggests that it is a conserved feature of Bryophyte transformation. *Biotechnology Letters* 29: 1591–1598.

PŘÍLOHY

Příloha č. 1: složení roztoků

Roztoky pro kultivaci *P. patens*

BCDAT médium

Zásobní roztoky:

MgSO ₄ · 7H ₂ O	5 g doplnit destilovanou vodou do 200 ml
KH ₂ PO ₄	10g doplnit destilovanou vodou do 200 ml
KNO ₃	20,2 g doplnit destilovanou vodou do 200 ml
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25 g doplnit destilovanou vodou do 200 ml
Ammonium tartrate	9,2 g doplnit destilovanou vodou do 200 ml

Z každého zásobního roztoku bylo přidáno 10 ml / 1l růstového média.

Stopové prvky:

CuSO ₄ · 5 H ₂ O	55 mg
H ₃ BO ₃	614 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	55 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	25 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	55 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	389 mg
KI	28 mg
Destilovaná voda	do 1 l

Ze zásobního roztoku bylo přidáno 1 ml / 1l růstového média.

PH výsledného roztoku BCDAT média by se mělo pohybovat v rozmezí 5,4 – 5,9. Nakonec bylo do roztoku přidáno 8 g plant agaru / 1 l média a sterilizováno autoklávováním. Těsně před nalitím do Petriho misek byl do média přidán 1 ml 1 M CaCl₂ / 1 l média (konečná koncentrace 1 mM).

LB medium (objem = 1 l)

10 g bacto trypton

10 g NaCl

5 g bacto yeast extract

8 g bacto agar

pH = 7

Roztoky pro působení genotoxiny

Zásobní roztok bleomycinu

Zásobní roztok bleomycinu 10 mg/ml byl připravován vždy bezprostředně před jeho použitím z navážek, které byly skladovány v lednici. Např. 1, 5 mg bylo rozpuštěno ve 150 µl destilované vody. Nespotřebovaný roztok byl vždy zlikvidován.

Zásobní roztok 2 – FA

15,3 mg 2- FA bylo rozpuštěno v 10 ml DMSO a pomocí injekční stříkačky sterilizováno přes stříkačkový filtr. Zásobní roztok (10 mM) byl rozpipetován do zkumavek o objemu 2 ml a skladován v mrazicím boxu.

Roztoky pro izolaci plasmidové DNA

Roztok pro resuspendování bakterií

25mM Tris – HCl (pH = 7,4)

10mM EDTA

50 µg/ml RNáza A

Roztok pro promývání bakterií

200 mM NaCl

10mM EDTA

50 mM Tris HCl (pH = 7,4)

50% Et OH

Lýzovací roztok

0,2 M NaOH

1% NaC₁₂H₂₅SO₄

Neutralizační roztok

2,55 M CH₃COOK

pH = 4,8

SOB médium (objem = 1 l)

20 g bacto trypton

5 g bacto – yeast extract

0,5 g NaCl

2,5 ml 1M KCl

10 ml 1M MgCl₂

pH= 7 (NaOH)

SOC médium

SOB + 20 mM glukóza

Nejprve byl připraven roztok 1M glukózy, která byla sterilizována ve flowboxu přes stříkačkový filtr pomocí injekční stříkačky. Roztok glukózy byl následně přidán do sterilního SOB média na konečnou koncentraci 20 mM.

Roztoky pro biolistickou transformaci

Zásobní roztok spermidinu

25, 5 mg spermidinu bylo rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Zásobní roztok (0,1 M) byl uchováván v mrazicím boxu.

Zásobní roztok G418

1g G418 byl rozpuštěn ve 20 ml destilované vody, sterilizován přes stříkačkový filtr pomocí injekční stříkačky a rozpipetován do zkumavek o objemu 2 ml. Zásobní roztok (50 mg/ml) byl uchováván v mrazicím boxu.

Příloha č. 2: použitý materiál

Kultivační skleničky s plastovými víčky (Magenta)

Papírová náplast 3M (Micropore)

Petriho misky (Falcon)

Jamkové kultivační desky (Iwaki)

Stříkačkové fitry s velikostí pórů 22 μm , materiál PVDF (Roth)

Papírové filtry s velikostí pórů 2, 7 μm (Merck millipore)

Erlenmayerovy baňky o objemu 100ml a 25 ml (Pyrex)

Příloha č. 3: použité chemikálie

Tris- HCL (Duchefa)

EDTA (Duchefa)

NaCl (Lach – Ner)

NaOH (Lach – Ner)

NaC₁₂H₂₅SO₄ (Serva)

CH₃COOK (Penta)

MgSO₄ · 7H₂O (Lach – Ner)

KH₂PO₄ (Lach- Ner)

KNO₃ (Lach – Ner)

FeSO₄ · 7 H₂O (Merck)

Ammonium tartrate (Fluka)

CuSO₄ · 5 H₂O (Merck)

H₃BO₃(Penta)

CoCl₂ · 6 H₂O (Merck)

Na₂MoO₄ · 2 H₂O (Serva)

ZnSO₄ · 7H₂O (Merck)

MnCl₂ · 4 H₂O (Sigma)

KI (Serva)

CaCl₂ (Serva)

D- glukóza (Duchefa)

MgCl₂(Penta)

Tris-base (Duchefa)

CH₃COOH (Lachema)

CH₃COONa (Lach – Ner)
Na₂EDTA (Duchefa)
Na₂HPO₄ (Penta)
KCl (Serva)
Sephadex (GE Healthcare)
Dimethylsulfoxid (Duchefa)
Bacto trypton (Duchefa)
Bacto yeast extract (Duchefa)
Bleomedac (Medac)
Geneticin sulfát (Gibco)
Methyl methansulfonát (Sigma)
2-Fluoroadenin (Sigma)
Spermidin trihydrochlorid (Sigma)
Primery (Sigma)
Agaróza pro elektroforézu (Invitrogen)
Plant agar (Duchefa)
Ethanol denaturovaný (P- lab)
Ethanol p.a. 96% (P-lab)
Restrikční endonukleázy (Fermentas)
Restrikční pufry (Fermentas)
DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
KOD Hot Start DNA Polymeráza (Millipore/Novagen)
QIAquick gel extractionkit (Qiagen)
High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)
Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer)

Příloha č. 4: použité přístroje

Homogenizátor Ultra-turrax T 25(IKA, Německo)
Dispergační nástavec k homogenizátoru (IKA, Německo)
Orbitální třepačka MS2 basic (IKA, Německo)
Digitální kruhová třepačka KS 501 (IKA, Německo)
Orbitální inkubátor IOC.400.XX2.C (Sanyo Gallenkamp, Velká Británie)

Třepačka thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)
Parní Sterilizátor PS 20A (Chirana, Československo)
Spektrofotometr WPA Biowave II (Biochrom)
Laminární box biohazard třídy II – typ EF/S 6 (Telstar, Nizozemsko)
Analytická váha AB204-S (Mettler Toledo, USA)
Inkubátor B 12 (Heraeus, Německo)
Sekvenátor Prism 3130x1 (Applied biosystems, USA)
PCR thermocycler (Bio Rad, USA)
Elektroforetická vana (Bio Rad, USA)
Zdroj pro elektroforézu Power Pack 300 (Bio Rad, USA)
Sestava na analýzu obrazu (Bio Rad, USA)
Kamera (Jenoptik, Německo)
Termoblok TB1 (Biometra, Německo)
UV crosslinker (Hofer, USA)

Příloha č. 5: použitý software

Program MacVector 12.7.5. (USA)
Program Clone Manager 9 (USA)

Příloha č. 6 : vlastní publikace

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2013, Article ID 535049, 7 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/535049>



Research Article

Genotoxin Induced Mutagenesis in the Model Plant *Physcomitrella patens*

Marcela Holá,¹ Jaroslav Kozák,² Radka Vágnerová,¹ and Karel J. Angelis¹

¹ Institute of Experimental Botany ASCR, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6, Czech Republic

² Institute of Organic Chemistry and Biochemistry ASCR, Flemingovo nám. 2, 1600 00 Praha 6, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Karel J. Angelis; karel.angelis@gmail.com

Received 4 October 2013; Accepted 14 November 2013

Academic Editor: Alma Balestrazzi

Copyright © 2013 Marcela Holá et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The moss *Physcomitrella patens* is unique for the high frequency of homologous recombination, haploid state, and filamentous growth during early stages of the vegetative growth, which makes it an excellent model plant to study DNA damage responses. We used single cell gel electrophoresis (comet) assay to determine kinetics of response to Bleomycin induced DNA oxidative damage and single and double strand breaks in wild type and mutant *lig4 Physcomitrella* lines. Moreover, *APT* gene when inactivated by induced mutations was used as selectable marker to ascertain mutational background at nucleotide level by sequencing of the *APT* locus. We show that extensive repair of DSBs occurs also in the absence of the functional *LIG4*, whereas repair of SSBs is seriously compromised. From analysis of induced mutations we conclude that their accumulation rather than remaining lesions in DNA and blocking progression through cell cycle is incompatible with normal plant growth and development and leads to sensitive phenotype.

1. Introduction

Plants developed several strategies to protect integrity of their genome against various environmental stresses. Common denominator of most of them is oxidative stress mediated by reactive oxygen species (ROS). The origin of ROS within the cell could be a consequence of physical or chemical genotoxic treatment, as well as byproduct of internal oxygen metabolism often triggered by external stimuli as drought and salinity. To be able to cope with oxidative stress we have to assess all faces of this challenge for plants; in particular, how it affects genetic material of the cells and how eventual changes are temporarily or permanently expressed in plant phenotype. This is why we need a flexible and robust model system, which experimentally enables the use of reverse genetics for genotoxic and biochemical studies. In this paper we describe a novel system to be considered for genotoxicity testing in plants.

The moss *Physcomitrella patens* is an emerging model plant [1] with the following differences/advantages as compared to other plant test systems: efficient homologous recombination (enabling reverse genetics of virtually any

gene), dominant haploid phase (enabling assessment of mutation phenotype), small size plantlets colonies with a quick and during early vegetative stage also filamentous growth, easy cultivation in inorganic media and several options of long term storage. Here we describe and validate a system of small protonemata fragments with high fraction of apical cells primarily developed for the purpose of genotoxicity testing. However, these one-day-old protonemata could be used as a substitute of protoplasts for other purposes, for example, for moss transformation [2].

APT (adenine phosphoribosyltransferase) is an enzyme of the purine salvage pathway that converts adenine into AMP and its loss of function generates plants resistant to adenine analogues, for example, 2-FA (2-Fluoroadenine) [3]. Mutational inactivation can be used as selectable marker for mutator genotyping as well as analysis of mutations in *APT* locus on nucleotide level [4–6].

This paper is an extension of our previous study of *Physcomitrella* knockout mutants of a key MRN (MRE11, RAD50, and NBS1) complex [6] with a pleiotropic effect on DSB repair in whole. We explore and validate the above outlined moss model system for genotoxicity testing in

plants. We describe a parallel use of SCGE (single cell gel electrophoresis, comet) assay for detection of DNA damage and its repair and of APT assay with sequencing analysis of mutants. On example of *lig4*, mutated in a key component of nonhomologous DSB-end joining pathway (C-NHEJ), we show consequences of mis repair. For strengthening the model concept we also present preliminary results of *prrad51AB* sensitivity to genotoxin treatment and on *ppku70* mutation rate.

2. Material and Methods

2.1. Plant Material. *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. "Gransden 2004" wild type and *pplig4* were vegetatively propagated as previously described [7]. The *lig4* and *ku70* mutants of C-NHEJ were generated by D. G. Schaefer, Neuchatel University, Switzerland, and F. Nogue, INRA, Paris, France, and kindly provided by F. Nogue. Detailed characteristic of this mutant will be published elsewhere. Mutant in both alleles of *Physcomitrella RAD51* gene (*prrad51AB*, clone 721) is described elsewhere [8] and was kindly provided by B. Reiss, MPIZ, Cologne, Germany.

Individual plants were cultured as "spot inocula" on BCD agar medium supplemented with 1mM CaCl₂ and 5 mM ammonium tartrate (BCDAT medium) or as lawns of protonemal filaments by subculture of homogenized tissue on BCDAT agar medium overlaid with cellophane in growth chambers with 18/6 hours day/night cycle at 22/18°C.

One-day-old protonemal tissue for repair and mutation experiments were prepared from one-week-old tissue scraped from plates, suspended in 8 mL of BCD medium, and sheared by a T25 homogenizer (IKA, Germany) at 10 000 rpm for two 1-minute cycles and let 24 hours to recover in cultivation chamber with gentle shaking at 100 rpm. This treatment yielded suspension of 3–5 cell protonemata filaments, which readily settle for recovery. Settled protonemata could be handled without excessive losses by tweezers on glass Petri plates.

2.2. Bleomycin Treatment and Sensitivity Assay. For treatments was used Bleomycin sulphate supplied as Bleomedac inj. (Medac, Hamburg, Germany). All solutions were prepared fresh prior treatment from weighted substance in BCDAT medium.

Protonemal growth was tested by inoculating explants of wild type and 5 mutant lines onto 6 × 4 multiwell plates organized to allow in line comparison of the effect of increasing Bleomycin concentrations. The wells were filled with 2 mL of standard growth BCDAT agar medium without or with 0.01, 0.1, and 1 μg mL⁻¹ Bleomycin. The experiment was carried in 3 independent replicas and monitored up to 3 weeks for growth of "spot inocula."

Treatment of one-day-old protonemata was performed on glass 5 cm Petri plates with the aid of bent tweezers to handle tissue and pipettes to remove excess liquids. Opening of yellow tips is generally small enough to avoid suction of moss filaments when drawing majority of liquid from tissue

prior blotting of collected tissue on filter paper to remove the rest.

In dose-response and repair kinetic experiments, one-day-old protonemata were after the Bleomycin treatment thoroughly rinsed in water, blotted on filter paper, and either flash-frozen in liquid N₂ (dose response and repair *t* = 0) or left to recover on plates in liquid BCDAT medium for the indicated repair times, before being frozen in liquid N₂.

For induction and regeneration of *apt* mutants one-day-old protonemata were after Bleomycin treatment thoroughly rinsed with H₂O, suspended in 2 mL of BCDAT medium, and spread on cellophane overlaid BCDAT agar plates, which were for selection supplemented with 2-FA (2-Fluoroadenine, Sigma-Aldrich, cat. Nr. 535087) and further incubated in growth chamber.

2.3. Detection of DNA Lesions. DNA single and double strand breaks were detected by a SCGE assay using either alkaline unwinding step A/N [9, 10] or fully neutral N/N protocol [11, 12] as previously described. In brief, approximately 100 mg of frozen tissue was cut with a razor blade in 300 μL PBS + 10 mM EDTA on ice and released nuclei transferred into Eppendorf tubes on ice. 70 μL of nuclear suspension was dispersed in 280 μL of melted 0.7% LMT agarose (GibcoBRL, cat. Nr. 15510-027) at 40°C and four 80 μL aliquots were immediately pipetted onto each of two coated microscope slides (in duplicate per slide), covered with a 22 × 22 mm cover slip and then chilled on ice for 1 min to solidify the agarose. After removal of cover slips, slides were immersed in lysing solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1 M EDTA, and 1% N-lauroyl sarcosinate, pH 7.6) on ice for at least 1 hour to dissolve cellular membranes and remove attached proteins. The whole procedure from chopping tissue to placement into lysing solution takes approximately 3 minutes. After lysis, slides were either first incubated 10 minutes in 0.3 M NaOH, 5 mM EDTA, pH 13.5 solution to allow partially unwind DNA double helix to reveal SSBs (A/N protocol) or without unwinding step (N/N protocol) directly equilibrated twice for 5 minutes in TBE electrophoresis buffer to remove salts and detergents. Comet slides were then subjected to electrophoresis at 1 V cm⁻¹ (app. 12 mA) for 3 minutes. After electrophoresis, slides were placed for 5 min in 70% EtOH, 5 min in 96% EtOH, and air-dried.

Comets were viewed in epifluorescence with a Nikon Eclipse 800 microscope stained with SYBR Gold (Molecular Probes/Invitrogen, cat. Nr. S11494) according to manufacture recommendation and evaluated by the LUCIA Comet cytogenetic software (LIM Inc., Czech Republic).

2.4. SCGE Assay Data Analysis. The fraction of DNA in comet tails (% tail-DNA, % T DNA) was used as a measure of DNA damage. Data for the wild type and the mutant *pplig4* line analysed in this study were obtained in at least three independent experiments. In each experiment, the % T DNA was measured at seven time points: 0, 5, 10, 20, 60, 180, and 360 min after the treatment and in control tissue without treatment. Measurements included four independent gel replicas of 25 evaluated comets totalled in at least 300

comets analysed per experimental point. The percentage of damage remaining as plotted on Figure 2(b) after given repair time (t_x) is defined as

$$\begin{aligned} & \% \text{ damage remaining } (t_x) \\ &= \frac{\text{mean \% tail-DNA } (t_x) - \text{mean \% tail-DNA (control)}}{\text{mean \% tail-DNA } (t_0) - \text{mean \% tail-DNA (control)}} \\ & \quad * 100. \end{aligned} \quad (1)$$

Time-course repair data were analysed for one- or two-phase decay kinetic by Prism v.5 program (GrafPad Software Inc., USA).

2.5. Isolation and Analysis of *apt* Mutants after Bleomycin Treatment. Mutation rates were measured as the number of *apt* mutants that appeared as green foci of regenerating clones resistant to 2-FA (Figure 3). Treated protonemata were first incubated approximately 3 weeks on plates with 2 or 3 mM 2-FA until first green foci start to emerge. Then whole cellophane overlay was transferred to a new plate with 8 mM 2-FA and emerging clones were allowed to form colonies. Stable clones were then counted.

Some clones were further propagated on plates with 8 mM 2-FA and their *APT* locus was subsequently PCR amplified and sequenced to identify the mutation(s) responsible for the resistance. Approximately 100 mg of tissue was used to isolate genomic DNA with DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, cat. Nr. 69104) using “ball” mill Retsch MM301 to homogenize the tissue in 2 mL round bottom Eppendorf tubes. *APT* locus was amplified from isolated genomic DNA with KOD Hot Start DNA Polymerase (Millipore/Novagen, cat. Nr. 71086), purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, cat. Nr. 28104) and used as a template for sequencing with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, cat. Nr. 4337455). Locations of PCR primers used for *APT* amplification and sequencing are depicted on Supplementary Figure 2 and their sequences are listed in Supplementary Table 1 (see Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2013/535049>). To keep sequencing cost down only half volume of the BigDye Ready Reaction Mix was used in a standard sequencing reaction and combined with the same volume of Half-Term-Dye-Termination mixture (Sigma-Aldrich, cat. Nr. H1282).

2.6. Analysis of Sequencing Data. Sequences of each clone obtained on genetic analyser Prism 3130x1 (Applied Biosystems, USA) were stitched together with MacVector program Assembler 12.7.5 (MacVector, USA) into contigs and aligned to the latest annotated *APT* sequence Pp1s114.124V6.1 in the COSMOSS—the *Physcomitrella patens* resource database (<https://www.cosmoss.org/>).

3. Results and Discussion

In all experiments a model *Physcomitrella patens* has been used as one day recovered fragments of 3–5 cell size derived from the lawn of growing protonema filaments by extensive

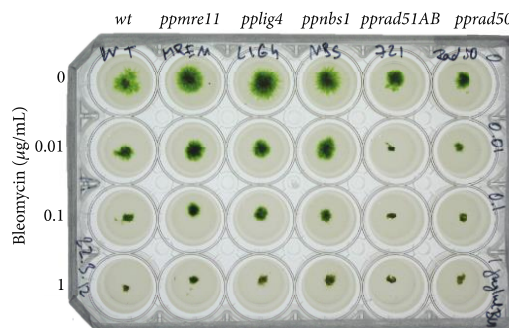


FIGURE 1: Sensitivity of the *Physcomitrella patens* repair mutants *mre11*, *lig4*, *nbs1*, *rad51AB*, and *rad50* to chronic exposure of Bleomycin. *Physcomitrella* explants were inoculated as “spot inocula” onto BCDAT-agar plates supplemented with 0, 0.01, 0.1, and 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Bleomycin and photographed 10 days after inoculation.

shearing. Such one-day-old protonemata represent a unique system among plants to study plant tissue with up to 50% of apical dividing cells. Convenient mechanical handling enables quick processing of tissue after the treatment to address short repair times and with fine tip tweezers also for uniform spotting to test sensitivity. In this respect one-day-old protonemata are preferred system to so far widely used protoplasts, which could be collected only by centrifugation. Another reason for using protonemata is possibility their mechanical disintegration by razor blade chopping for rapid release of nuclei for SCGE assay. In this way direct use of protoplasts for comet assay is obstructed by nearly instant regeneration of the cell wall within 4 hours after the release from cellulase treatment (unpublished observation), because cell wall prevents DNA movement from nuclei during electrophoresis.

3.1. Sensitivity to Bleomycin Treatment. Moss wild type and *pplig4*, *mre11*, *nbs1*, *rad51AB*, and *rad50* [6, 8] mutant lines were analysed for their sensitivity to radiomimetic Bleomycin in chronic “survival” assay when test plates with various concentrations of Bleomycin were inoculated with equal tissue “spots” of one-day-old protonemata and incubated up to 3 weeks (Figure 1). Only *rad51AB* and *rad50* strains displayed one order of a magnitude higher sensitivity in comparison to other tested lines. The survival growth of *ppmre11* is somehow in contradiction with previous results of Kamisugi et al. [6], but one has to realize different assay conditions, for example, acute versus chronic exposure and protoplast cells versus protonemata. In protonema tissue under permanent genotoxic stress *mre11* express phenotype similar to wild type, *nbs1*, and also *lig4*. One can speculate that 3' to 5' exonuclease and endonuclease activity associated with MRE11 is dispensable for tissue survival, but proteins RAD50 and RAD51 supporting DNA structure are not. Kozak et al. [12] previously showed crucial role of structural maintenance

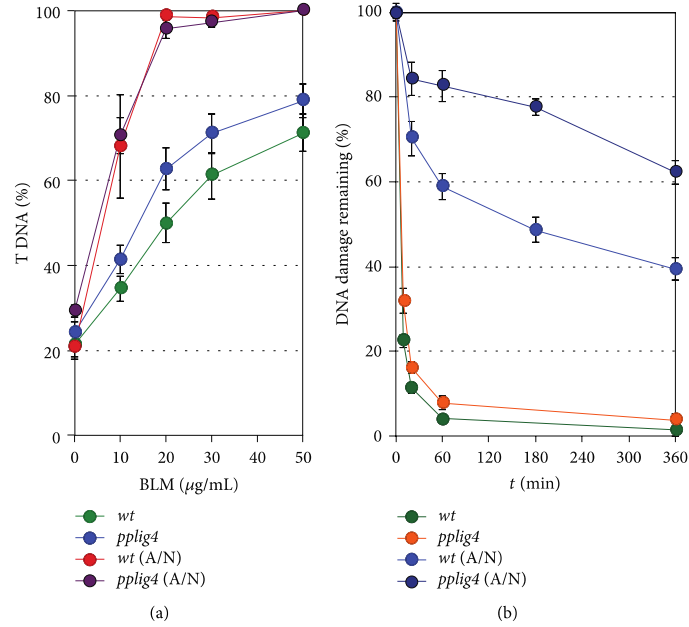


FIGURE 2: SSB and DSB repair kinetics determined by SCGE. One-day regenerated protonemal tissue from wild type and *pplig4* lines was treated with Bleomycin for 1 h prior to nuclear extraction and the analysis. (a) Dose-response as the percentage of the free DNA moved by electrophoresis into comet tail (% T DNA) at the indicated Bleomycin concentrations. DSBs were determined by N/N protocol: green: wild type, blue: *pplig4*, whereas SSBs were determined by A/N protocol: red: wild type, dark purple: *pplig4*. (b) Repair kinetics is plotted as % of DSBs remaining over the 0, 5, 10, 20, 60, 180, and 360 min period of repair recovery. Maximum damage is normalised as 100% at $t = 0$ for all lines. SSBs were induced by 1-hour treatment with $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ Bleomycin; bright blue: wild type, dark blue: *pplig4*, and determined by A/N protocol. DSBs were induced by 1-hour treatment with $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ Bleomycin, green: wild type, orange: *pplig4*, and determined by N/N protocol. (Error bars-standard error).

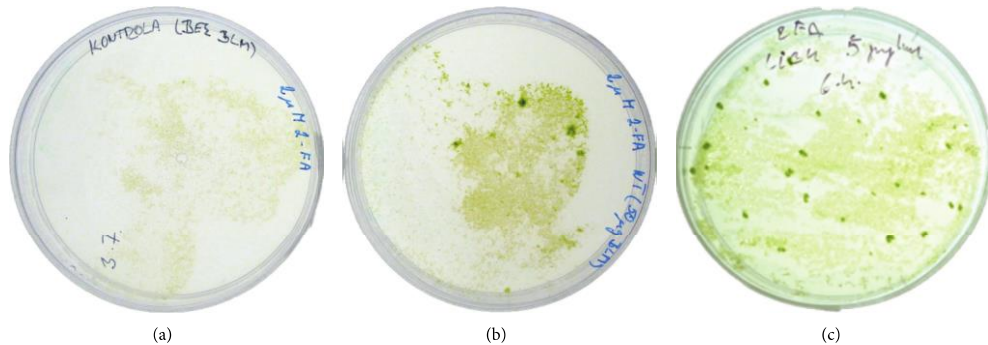


FIGURE 3: Plates with 2-FA resistant foci of wild type *Physcomitrella* (a and b) and *pplig4* (c) after 3 weeks of selection. (a) Untreated *Physcomitrella* wild type, (b) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Bleomycin treated wild type protonemata for 2 hours, and (c) $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Bleomycin treated *pplig4* protonemata for 1 hour prior being spread on plates with BCDAT medium supplemented with $2 \mu\text{M}$ 2-FA and cultivated for 3 weeks.

of chromosome complex SMC5/6 in the repair of Bleomycin induced DSBs. In this context RAD50s have similar structural role in MRN complex as SMCs in the structure of the SMC5/6 complex [13]. Both these complexes can function in tethering of broken ends in close proximity.

3.2. Induction of DNA Lesions and Their Repair. Bleomycin, an ionizing radiation mimicking agent, functions as a catalyst activated by interaction with DNA and attachment of Fe^{2+} to produce oxygen radicals leading to lesions as SSBs, DSBs, AP-sites, and damaged bases [14, 15], which all could be

readily detected by SCGE [16]. DNA breaks and other lesions converted to breaks lead to DNA fragmentation and nucleoid unwinding allowing relaxed DNA to move in electric field from nuclei out to form a “comet” like object in which increased quantity of fragmented DNA in comet tail (% T DNA) is proportional to breakage. DSBs are detected by an N/N assay when pH of lysing and electrophoretic solutions is kept under pH 10, whilst for the detection of SSBs DNA after the lysis is allowed to unwind DNA double-helix in alkali [17] to separate individual strands and expose their fragmentation (A/N protocol [9]).

Bleomycin fragmentation of genomic DNA by induction of SSBs and DSBs is documented on Figure 2(a). Ten times higher efficiency to induce SSBs than DSBs is in agreement with generally accepted ratio of 1:10, DSBs versus SSBs, induced by ionizing radiation. Evidently this also applies for Bleomycin treatment of *Physcomitrella*. The background level of genomic DNA damage in wild type and *pplig4* is similar, between 20 and 25% T DNA, indicating that the repair defect has no significant effect on natural levels of genomic DNA fragmentation. Nevertheless, in comparison with wild type, *pplig4* is vulnerable to Bleomycin induction of DSBs and SSBs.

In both wild type and *pplig4* lines, the Bleomycin induced DSBs are repaired with a rapid, biphasic kinetics (Figure 2(b)). Half-lives of DSB survival $\tau_{1/2}$ 1.5 min for wild type and 2.5 min for *pplig4* are similar to $\tau_{1/2}$ 2.9 min for *pprad50*, $\tau_{1/2}$ 4.1 min for *ppmre11*, and $\tau_{1/2}$ 1.9 min for *ppnbs1* previously reported in [6].

Contrary to DSBs, SSBs are repaired far less efficiently. Slow SSB repair might be common feature of plants since Donà et al. [18] recently observed similar phenomenon in *Medicago truncata* cell culture irradiated with different doses of γ -ray. The SSB repair kinetic in wild type *Physcomitrella* is clearly biphasic and in this respect parallels repair of MMS induced SSBs in *Arabidopsis* [19]. In comparison to DSBs, substantially smaller fraction of SSBs is repaired with fast kinetics; the defect even more manifested in *pplig4*. It suggests an important role for LIG4 in the repair of DNA lesions like modified basis, AP sites that are usually detected as SSBs and are repaired via BER (base excision repair). It is noteworthy that LIG3, the ligase finishing BER pathway, is not represented in plants. We showed earlier that principal substitute for LIG3 in *Arabidopsis* is LIG1 [19]. The repair kinetic of MMS induced SSBs in *atlig1* posed an exceptional route. After the treatment the number of breaks continues to increase during the first hour of repair and after 3 hours returns to the level at the end of treatment. Then repair continues similarly as in the wild type (see Figure 4 in [19]). Because *atlig1* is an *RNAi* line with only 40% of remaining LIG1 activity, such repair course is a consequence of unbalanced BER due to attenuated ligation step. Evidently the knockout mutation in *pplig4* does not have such severe effect on repair of SSBs; nevertheless, the defect clearly shows that LIG4 is also involved in the repair of SSBs in plants.

3.3. Induction and Analysis of *apt* Mutants. The mutator phenotype was assessed as the loss of function of the *APT* gene [4] due to presence or error prone repair of endogenous

DNA damage in the wild-type moss and *lig4*, *mre11*, and *rad50* repair mutant lines.

We found dramatic, over two orders of magnitude, variation of mutator phenotype in response to mutagenic treatment. While wild type *Physcomitrella* with low mutator phenotype needed 2 hours and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Bleomycin treatment to induce any *apt* clone, in *pprad50* with high mutator phenotype 1 hour treatment with only $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Bleomycin was enough for massive induction of *apt* clones. Other lines, *pplig4* and *ppmre11*, assumed as having “moderate” mutator phenotype, were mutagenized either with 5 or, respectively, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Bleomycin for 1 hour. Mutagenesis and clone selection in *Physcomitrella* wild type and *pplig4* is depicted on Figure 3. For comparison we normalised the yield of 2-FA resistant clones to $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Bleomycin treatment per 1g dry tissue weight in each line as “relative number of *ppapts*.” The values of these normalised yields range from 9 in wild type to 875 for *pprad50* (see Supplementary Figure 1 where are plotted summarized results of Bleomycin mutagenesis in *Physcomitrella* wild type and *lig4*, *ku70*, *rad50*, *mre11*, and *nbs1* mutants).

Randomly picked *apt* clones from selection plates were further propagated on 2-FA media to provide enough material for isolation of genomic DNA and sequencing analysis of *APT* locus. Results of sequencing analysis are pictured in Figure 4 and detailed annotations of identified mutations are summarized in Supplementary Table 2. In total were analysed 5 clones of *Physcomitrella* wild type, 4 clones of *pplig4*, 3 clones of *ppmre11*, and 6 clones of *pprad50* and identified 48 mutations. Mutations were according to assumed mechanism of formation classified as reversions, single base insertion or deletion, and insertions or deletions larger than 2 bases either in coding (exons) or noncoding regions of *APT* locus.

Most of the identified mutations are as expected localised within CDS, in particular within exon 4 that is annotated as coding for adenine salvage activity (see Figure 4). Nevertheless, in *wt:1*, *lig4:1*, *lig4:2*, and *mre11:6 apt* clones, mutations were identified only in the noncoding region and their contribution to mutated *APT* phenotype has to be established. Majority of mutations in CDS are point mutations (base substitution, single base insertions, and deletions) and it is difficult to dissect the route of their formation. Some of single base deletions could come from classical or altered NHEJ repair of DSBs [20], but more likely they represent along with other point mutations outcome of processing base oxidative damage. Interesting point is that only single base insertions were identified in *APT* CDS of *pplig4*. Insertion of extra base might imply defect in BER repair of oxidative damage in the absence of LIG4 and could be associated with defective repair of SSBs in *pplig4*.

Long deletions are clearly associated with NHEJ repair of DSBs, because, besides one rather short (8 bp) deletion in *wt:3* clone, all appear in clones derived from *mre11* and *rad50* background. This supports our working hypothesis that MRN-supervised repair generates more severe forms of genomic damage [6].

Only one 4 base insertion was identified in noncoding region of *wt:2*.

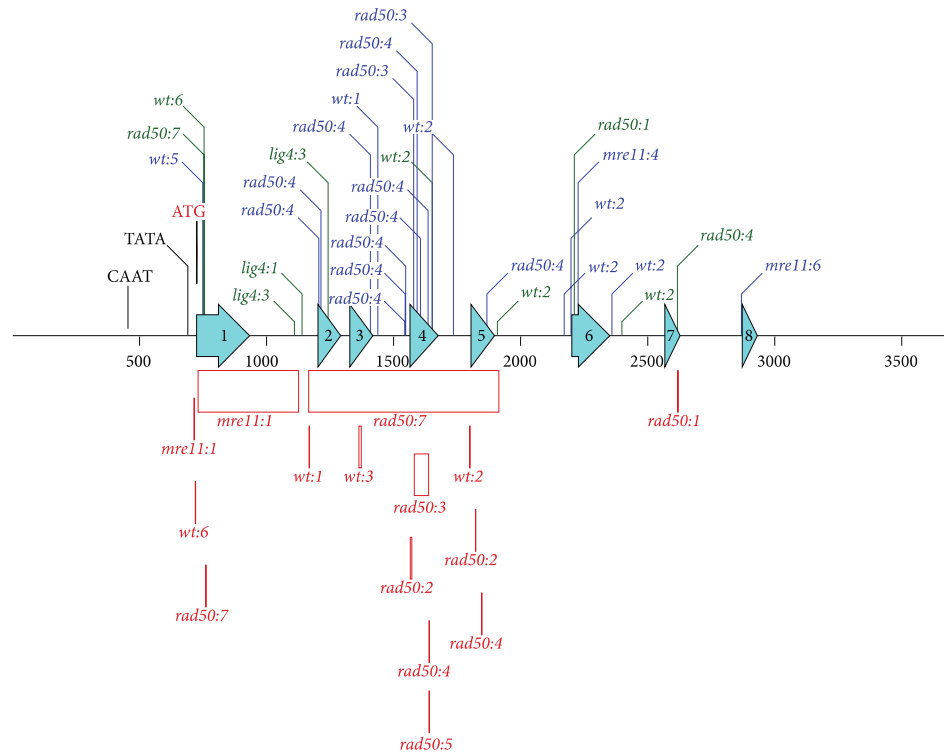


FIGURE 4: Map of identified mutations within *APT* locus. Bleomycin induced mutations are identified by color (blue: substitutions, green: insertions, and red: deletions) and tagged according to background as *wt*, *lig4*, *mre11*, and *rad50* and the number of line in which mutation was detected. Deletions are shown as boxes of size proportional to their length. On the locus map are depicted 500 nucleotide size markers and eight turquoise hollow arrows representing exons of *APT* CDS. Detailed description of each mutation is provided in Supplementary Table 2.

4. Conclusions

We validated the use of regenerating one-day-old protonemal tissue of *Physcomitrella patens* for complex analysis of genotoxic stress by parallel study of DNA damage, its repair, and mutagenic consequences in wild type and *lig4* mutant plants. From experimental point of view we developed a novel model system where 3–5 cell protonemata filaments with up to 50% of apical cells can substitute and surplus protoplasts use. Bleomycin was used to model DNA oxidative genotoxic stress with all its consequences as SSBs and DSBs, which can be followed by SCGE. We confirmed in *Physcomitrella* as previously in *Arabidopsis* rapid DSB repair even in the absence of *LIG4*, the key ligase of major DSB repair pathway by NHEJ mechanism [12]. Moreover, we showed crucial role of *LIG4* in the repair of SSBs by BER mechanism, where it can substitute along with *LIG1* [19] in plants missing *LIG3*. We selected and analysed by sequencing 2-FA resistant clones with Bleomycin mutated *APT* locus and found out that mutation spectra of *lig4* mutant reflects rather the defect of SSB than DSB repair. Nevertheless, as previously described [6], we interpret that mutations due to the error prone

repair in *pplig4* rather than unrepaired lesions within DNA and interfering with progression through the cell cycle are responsible for *pplig4* sensitive phenotype.

Abbreviations

A/N:	Comet assay with alkaline unwinding step
AP:	Apurinic/aprimidinic (site)
APT:	Adenine phosphoribosyltransferase
BER:	Base excision repair
CDS:	Coding DNA sequence
DSB(s):	DNA double-strand break(s)
2-FA:	2-Fluoroadenine
HR:	Homologous recombination
MMS:	Methyl methanesulfonate
NHEJ:	Nonhomologous end joining
N/N:	Neutral comet assay
ROS:	Reactive oxygen species
SCGE:	Comet assay
SSB(s):	DNA single-strand break(s)
$\tau_{1/2}$:	Half-life.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

Czech Science Foundation (13-06595S) and Ministry of Education, Youth, and Sport CR (LD13006) supported this work. The authors appreciate Dr. Andrew Cuming's help with sequences and mutations analysis.

References

- [1] D. J. Cove, C. D. Knight, and T. Lamparter, "Mosses as model systems," *Trends in Plant Science*, vol. 2, no. 3, pp. 99–105, 1997.
- [2] M. Šmídková, M. Holá, and K. J. Angelis, "Efficient biolistic transformation of the moss *Physcomitrella patens*," *Biologia Plantarum*, vol. 54, no. 4, pp. 777–780, 2010.
- [3] C. Gaillard, B. A. Moffatt, M. Blacker, and M. Laloue, "Male sterility associated with APRT deficiency in *Arabidopsis thaliana* results from a mutation in the gene APT1," *Molecular & General Genetics*, vol. 257, no. 3, pp. 348–353, 1998.
- [4] B. Trouiller, D. G. Schaefer, F. Charlot, and F. Nogué, "MSH2 is essential for the preservation of genome integrity and prevents homeologous recombination in the moss *Physcomitrella patens*," *Nucleic Acids Research*, vol. 34, no. 1, pp. 232–242, 2006.
- [5] B. Trouiller, F. Charlot, S. Choinard, D. G. Schaefer, and F. Nogué, "Comparison of gene targeting efficiencies in two mosses suggests that it is a conserved feature of Bryophyte transformation," *Biotechnology Letters*, vol. 29, no. 10, pp. 1591–1598, 2007.
- [6] Y. Kamisugi, D. G. Schaefer, J. Kozak et al., "MRE11 and RAD50, but not NBS1, are essential for gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*," *Nucleic Acids Research*, vol. 40, no. 8, pp. 3496–3510, 2012.
- [7] C. D. Knight, A. C. Cuming, and R. S. Quatrano, "Moss gene technology," in *Molecular Plant Biology Volume 2*, P. M. Gilmartin and C. Bowler, Eds., vol. 2, pp. 285–299, Oxford University Press, Oxford, UK, 2002.
- [8] U. Markmann-Mulisch, E. Wendeler, O. Zobel, G. Schween, H.-H. Steinbiss, and B. Reiss, "Differential requirements for RAD51 in *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis thaliana* development and DNA damage repair," *Plant Cell*, vol. 19, no. 10, pp. 3080–3089, 2007.
- [9] K. J. Angelis, M. Dusinska, and A. R. Collins, "Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity," *Electrophoresis*, vol. 20, no. 10, pp. 2133–2138, 1999.
- [10] M. Menke, I.-P. Chen, K. J. Angelis, and I. Schubert, "DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins," *Mutation Research*, vol. 493, no. 1-2, pp. 87–93, 2001.
- [11] P. L. Olive and J. P. Banáth, "The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells," *Nature Protocols*, vol. 1, no. 1, pp. 23–29, 2006.
- [12] J. Kozak, C. E. West, C. White, J. A. da Costa-Nunes, and K. J. Angelis, "Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis thaliana* is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance," *DNA Repair*, vol. 8, no. 3, pp. 413–419, 2009.
- [13] J. M. Murray and A. M. Carr, "Smc5/6: a link between DNA repair and unidirectional replication?" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 2, pp. 177–182, 2008.
- [14] R. J. Steighner and L. F. Povirk, "Bleomycin-induced DNA lesions at mutational hot spots: implications for the mechanism of double-strand cleavage," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 21, pp. 8350–8354, 1990.
- [15] A. G. Georgakilas, "Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge," *Molecular BioSystems*, vol. 4, no. 1, pp. 30–35, 2007.
- [16] A. G. Georgakilas, S. M. Holt, J. M. Hair, and C. W. Loftin, "Measurement of oxidatively-induced clustered DNA lesions using a novel adaptation of single cell gel electrophoresis (comet assay)," in *Current Protocols in Cell Biology*, S. J. Bonifacino et al., Ed., chapter 6, p. 6.11, John Wiley & Sons, 2010.
- [17] G. Ahnström and K. Erixon, "Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution," *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*, vol. 23, no. 3, pp. 285–289, 1973.
- [18] M. Donà, L. Ventura, A. Balestrazzi et al., "Dose-dependent reactive species accumulation and preferential double-strand breaks repair are featured in the γ -ray response in *Medicago truncatula* cells," *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013.
- [19] W. M. Waterworth, J. Kozak, C. M. Provost, C. M. Bray, K. J. Angelis, and C. E. West, "DNA ligase 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA single and double strand breaks," *BMC Plant Biology*, vol. 9, article 79, 2009.
- [20] C. Charbonnel, E. Allain, M. E. Gallego, and C. I. White, "Kinetic analysis of DNA double-strand break repair pathways in *Arabidopsis*," *DNA Repair*, vol. 10, no. 6, pp. 611–619, 2011.



Contents lists available at ScienceDirect

Plant Physiology and Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plaphy

Mutagenesis during plant responses to UVB radiation

M. Holá, R. Vágnerová, K.J. Angelis*

Institute of Experimental Botany AS CR, Na Karlovce 1, 160 00 Prague 6, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2014

Accepted 16 December 2014

Available online xxx

Keywords:

UV dimers

DNA repair

Error-prone bypass

Comet assay

APT mutagenesis

ABSTRACT

We tested an idea that induced mutagenesis due to unrepaired DNA lesions, here the UV photoproducts, underlies the impact of UVB irradiation on plant phenotype. For this purpose we used protonemal culture of the moss *Physcomitrella patens* with 50% of apical cells, which mimics actively growing tissue, the most vulnerable stage for the induction of mutations. We measured the UVB mutation rate of various moss lines with defects in DNA repair (*pplig4*, *ppku70*, *pprad50*, *ppmre11*), and in selected clones resistant to 2-Fluoroadenine, which were mutated in the adenosine phosphotrasferase gene (*APT*), we analysed induced mutations by sequencing. In parallel we followed DNA break repair and removal of cyclobutane pyrimidine dimers with a half-life $\tau = 4$ h 14 min determined by comet assay combined with UV dimer specific T4 endonuclease V. We show that UVB induces massive, sequence specific, error-prone bypass repair that is responsible for a high mutation rate owing to relatively slow, though error-free, removal of photoproducts by nucleotide excision repair (NER).

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The majority of UVB photoproducts, pyrimidine dimers (CPD) and pyrimidine(6–4)pyrimidinone dimers (6–4 PP), are removed in plants by blue light (320–450 nm) induced direct dimer reversal with photolyases specific for CPDs as well as 6–4 PP (Britt, 1995). Light repair is efficient and error free, nevertheless half-life of CPDs removal is about 1 h (Pang and Hays, 1991) and for complete elimination of 6–4PPs are needed at least 2 h (Waterworth et al., 2002; Chen et al., 1994), during which other mechanisms can take place. In contrast to photoreactivation, dark repair pathways do not directly reverse DNA damage, but instead replace the damaged DNA with new, undamaged nucleotides. There are recognized to be two possible mechanisms relying either on excision of dimers or on their tolerance by trans-lesion synthesis, of which replicative polymerases are also capable (Rabkin et al., 1983). CPDs and 6–4 PP are recognized and removed due to their “bulky” distortion of the DNA double helix by nucleotide excision repair (NER), a repair mechanism able to cope with a broad spectrum of

DNA lesions that disturb the conformation of DNA, by error-free replacement of the DNA strand containing the lesion in a range of 2–4 helical turns (20–40 nucleotides) by a newly synthesized patch. Both photoreactivation and NER are error free, and so we asked which mechanism underlay the generally observed high mutagenic as well as severe carcinogenic risk caused by UV irradiation. The most relevant form of UV for the induction of biological effects is UVB, since UVC hardly penetrates the Earth’s atmosphere. In the present research we used a recently-described approach employing regenerating one-day-old protonemal tissue of *Physcomitrella patens* (Hála et al., 2013) for complex analysis of UVB genotoxic stress in laboratory conditions by parallel study of DNA damage, its repair and its mutagenic consequences in wild type and *pplig4*, *pprad50*, *ppmre11*, *ppku70* mutants, to ascertain the nature of observed high rates of UV mutagenesis.

2. Materials and methods

Detailed description of Materials and Methods is in Appendix A.

2.1. Plant material

P. patens (Hedw.) B.S.G. “Gransden 2004” wild type and *pplig4*, *pprad50*, *ppmre11* were described previously (Hála et al., 2013; Kamisugi et al., 2012) along with cultivation and treatment conditions. The *ppku70* mutant in the canonical non-homologous DSB repair pathway (C-NHEJ) was generated and kindly provided by D.

Abbreviations: A/N, comet assay protocol with alkaline unwinding step; APT, adenine phosphotrasferase; BER, base excision repair; CPD, cyclobutyl pyrimidine dimer; 2FA, 2-Fluoroadenine; NER, nucleotide excision repair; N/N, neutral comet assay; 6–4 PP, pyrimidine(6–4)pyrimidinone dimer; SSB, DNA single strand break; τ , half-life; T4EndoV, T4 Endonuclease V.

* Corresponding author.

E-mail address: karel.angelis@gmail.com (K.J. Angelis).<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.12.013>

0981-9428/© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Holá, M., et al., Mutagenesis during plant responses to UVB radiation, *Plant Physiology and Biochemistry* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.12.013>

G. Schaefer, Neuchatel University, Switzerland.

Appendix Figure A.4 and Table A.1.

2.2. UV and Bleomycin treatment

Laboratory broadband UVB irradiation was carried in a Hoefer UV crosslinker with the unwanted UVC fraction filtered out by a cellulose acetate sheet (Britt et al., 1993) overlaying samples and a crosslinker UV gauge (Figure A.2). Insertion of the sheet increased by about 20% the time needed for the crosslinker to achieve the set irradiation dose; e.g. from 40 to 50 s to deliver dose 3 kJ m^{-2} . To block light repair, irradiation and recovery cultivation were performed in dark and collection and freezing of samples under red light in a darkroom. In mutation experiments, samples were kept in the dark for 24 h after irradiation to allow induction of mutations.

Bleomycin inj. (Medac, Hamburg, Germany) was used for Bleomycin treatment as previously described (Hála et al., 2013).

All studies were performed with protonemata 1 day following homogenisation, having approximately 50% of actively dividing cells (Fig. A.1).

2.3. Detection of DNA lesions

DNA single strand breaks (SSBs) were detected by an A/N comet assay using neutral protocol with an alkaline unwinding step (Angelis et al., 1999; Menke et al., 2001; Olive and Banath, 2006). For specific detection of CPDs, T4 endonuclease V (T4EndoV) digestion step was included in the protocol after cell lysis. T4EndoV enzyme was prepared as a crude lysate from overexpressing bacteria (Collins, 2011; Valerie et al., 1985). Thirty minutes digestion of nuclear DNA of cells irradiated by 3 kJ m^{-2} with T4EndoV diluted 1:500 at room temperature generated app. 95% DNA fragmentation (Fig. A.3). Without T4EndoV treatment, the fraction of fragmented DNA in comet tails increased after irradiation only to 10% from 1 to 2 % of background value.

Comets on slides were stained with SYBR Gold (Molecular Probes/Invitrogen), viewed in epifluorescence with a Nikon Eclipse 800 microscope and captured and evaluated by the LUCIA Comet cytogenetic software (LIM Inc., Czech Republic).

2.4. Analysis of comet assay data

The fraction of fragmented DNA in comet tails (% T DNA) was used as a measure of DNA damage, nevertheless for an easy comparison of SSBs and CPDs repair kinetics, comet data are rather expressed as % of remaining damage, where damage after UV irradiation at $t = 0$ is set 100% for both lesions (Eq. (A.1)).

Data in this study were obtained in at least three independent experiments. Measurements of blind-labelled comet slides included 25 evaluated comets of four independent gel replicas in each experiment that totalled at least 300 comets analysed per experimental point. Time-course data were analysed for one-phase decay kinetics by Prism v.5 program (GrafiPad Software Inc., USA).

2.5. Isolation and analysis of APT mutants

The dose 500 J m^{-2} was used to induce mutations in APT. After irradiation, samples were kept in darkness for 24 h to block light repair and generate mutations. Mutation rates were measured as the number of APT mutants that appeared as green foci of regenerating clones resistant to 2-Fluoroadenine (2FA). Treated protonemata were cultivated on plates with $8 \mu\text{M}$ 2FA and emerging foci were allowed to form colonies. Stable clones were then counted. Randomly selected clones were further propagated and their APT locus was PCR amplified and sequenced to identify the mutation(s) responsible for resistance. Details of mutant analysis are in

3. Results and discussion

3.1. Repair of UVB induced lesions

Repair of CPDs and 6-4PPs by excision NER pathway proceeds in four steps: Recognition of distorted DNA double helix by a “bulky” lesion, incision of the DNA strand on both sides of a lesion, filling the gap by DNA repair synthesis and religation of a newly synthesized patch.

DNA breaks formed during the incision step of dimer repair can be followed as SSBs by the A/N comet assay because they lead to fragmentation of nuclear DNA. Kinetics of formation and removal of SSBs during repair is plotted in Fig. 1 (open circles). Data are expressed as % of remaining damage, with damage after UV irradiation at $t = 0$ set to 100%. An increased number of SSBs due to NER is observed during period of approximately 6 h, with a peak at 1 h, when the number of breaks nearly doubles and is then followed by a gradual decrease, indicating saturation of repair capacity after 1 h and steady-state progression of repair afterwards. After 6 h the level of SSBs is the same as immediately after UV irradiation.

Removal of CPDs from nuclear DNA was followed after their conversion to SSBs by digestion of nuclei already embedded on comet slides with the CPD specific endonuclease T4EndoV prior to DNA unwinding and electrophoresis. T4EndoV has two associated enzyme activities: pyrimidine dimer glycosylase cleaving the glycosyl bond of the 5'-pyrimidine of CPD and AP-endonuclease cleaving the phosphodiester bond at a glycosylase-generated AP site. The kinetics of CPD removal in *P. patens* follows first order kinetics with an estimated half-life $\tau = 4 \text{ h } 14 \text{ min}$ (Fig. 1, closed circles). As reported in *Arabidopsis*, CPD dark repair is several times slower than light repair and this might be true also in *P. patens* (Britt et al., 1993).

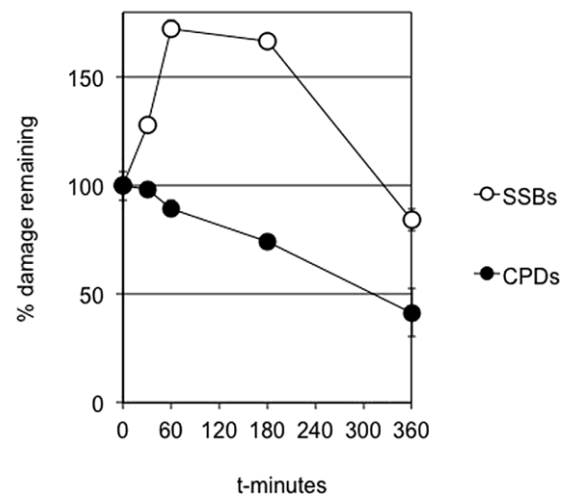


Fig. 1. The repair kinetics of SSBs and CPDs induced by 3 kJ m^{-2} UVB irradiation. Both SSBs and CPDs were determined in the same sample from which comet slides were prepared and processed either with or without the T4EndoV digestion step. Data are expressed as % of remaining damage, when damage after irradiation $t = 0$ is set to 100%. The number of SSBs first increases as a consequence of NER incisions, reaching a maximum after 1 h and then as NER proceeds their number decreases (opened circles). The number of induced CPDs gradually decreases from $t = 0$ following first order kinetics with a CPD half-life $\tau = 4 \text{ h } 14 \text{ min}$ (closed circles).

3.2. UVB mutagenesis

Slow dark NER repair of UV dimers opens the possibility for their eventual, more rapid error-prone repair or any other error-prone tolerance mechanism that might underlie observed UV mutagenicity. For this reason we decided to detect mutagenesis endpoints as changes at the DNA sequence level.

Mutations in genes of nucleotide metabolism like *APT* confer resistance to halogenated bases like 2FA, which, when utilized by cell metabolism are toxic. This feature is used as a positive selection marker for identification of mutants. PCR amplification of the mutated gene DNA and its sequence analysis provides a description of the acquired mutations and gives an insight into how they occurred.

Firstly we examined the number of regenerating *APT* mutants in *P. patens* wild type and *pprad50*, *ppmre11*, *pplig4* and *ppku70* mutants, appearing spontaneously or induced by 500 J m⁻² UVB, 1 mM MMS and 1 µg mL⁻¹ Bleomycin and normalized the count to 1 g of dry tissue weight. Results are summarized in Fig. 2 (partial results of Bleomycin mutagenesis were previously published in (Holá et al., 2013; Kamisugi et al., 2012)). UV mutagenesis proved to be effective in the wt and repair mutants studied. Aside from an exceptional and enigmatic role of RAD50 in UV mutagenesis, we can speculate about the higher rate of UV mutagenesis in the *pplig4* background. Holá et al. (Holá et al., 2013) described a repair defect of oxidative damage by base excision repair (BER) and showed that LIG4, perhaps along with LIG1 (Waterworth et al., 2009) could substitute in plants that lacked LIG3 in this pathway. If we assume that absence of LIG4 abolishes the active error free BER pathway, then any error-prone repair or bypass of UV induced dimers becomes more relevant and could contribute to higher rates of mutagenesis. This is an interesting point, because BER repair of CPDs in plants was never previously seriously considered (Britt, 1995) regardless of the fact that this mechanism is active in bacteria (bacteriophage T4EndoV used in this study for detection of CPDs is an example) and perhaps also in other organisms.

3.3. Sequence analysis of UVB induced mutations

For detailed analysis of induced mutations we picked at random clones from mutation experiments and after their propagation isolated DNA and sequenced the *APT* locus. In all sequenced *APT* mutants we found mainly cytosine to thymine transitions (Table 1)

that are typically formed after UV irradiation generating nearly exclusively pyrimidine dimers, but that rarely occur after other type of treatment like Bleomycin. UVB and Bleomycin induced mutations are summarized in Table B.1.

The production of mutations by agents that block DNA synthesis, such as CPDs, requires that there should be a mechanism to bypass the lesion so that the cell can remain viable even if the lesion is not removed. Trans-dimer bypass involves two steps: addition of a base opposite the damaged site and subsequent synthesis past the lesion. Error-prone bypass of CPD not compensated by removal of CPDs is responsible for a high mutation rate. The tendency to insert adenine opposite the first pyrimidine (and presumably also opposite the second) means that a large proportion of mutations will be “lost” because of insertion of the “correct” base, because thymine is the most frequent pyrimidine in dimers. Also, transitions should be more frequent than transversions because of the preference for purine insertions opposite pyrimidines (Rabkin et al., 1983). The high UV mutation rates indicate that in *P. patens* the error-prone bypass is very frequent and efficient on CPDs and on 6–4PPs that have not been removed by photolyases or by NER. This is also manifested by exclusive localization of UV induced transitions within exons 3, 4 and 5 in contrast to far more dispersed distribution of Bleomycin mutations (Fig. 3) that range from transitions/transversions, small (≥ 2 bp) deletions or insertions to large deletions up to 748 bp (Table B.1).

In our study we used artificial laboratory conditions (total dark or red light illumination) to dissect dark repair during dimer repair or 24-h fixation of mutations. Nevertheless in the real world under the daylight, when source of UV is sunshine, there is still approximately a 2-h window between induction of dimers by UV irradiation, before their elimination by light repair (Waterworth et al., 2002; Chen et al., 1994). NER is even slower than photoreactivation and thus cannot significantly contribute to offset consequences of quick error-prone repair. Moreover bypass is independent on the repair mechanism tested here by studying moss repair mutants and is solely dependent on ongoing DNA synthesis during irradiation. This is why we were able to follow the consequences of UV irradiation in a 1 day-subcultured protonemal culture with 50% of cells active in mitosis.

4. Summary

In actively dividing, apical plant cells, exposure to UVB induce

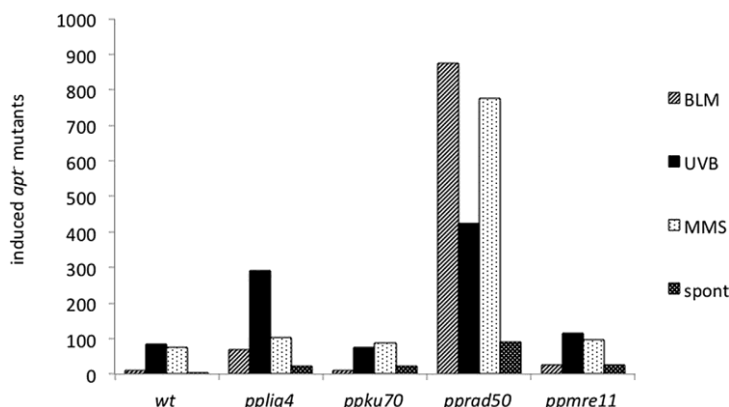


Fig. 2. Relative numbers of 2FA resistant mutants of *Physcomitrella patens* wild type and *pprad50*, *ppmre11*, *pplig4* and *ppku70*, differentiated into spontaneously appearing mutants and mutants induced by 500 J m⁻² UVB, 1 mM MMS and 1 µg mL⁻¹ Bleomycin respectively. The number of detected *APT* mutants is normalised to 1 g of dry tissue weight.

Table 1

Mutations induced by UVB irradiation within the *APT* locus of wt, *prrad50*, *ppmre11*, *pplig4* and *ppku70*. The observed spectra of induced mutations are principally base–substitution transitions.

Mutant line	<i>APT</i> mutant	Noncoding parts			Exons		
		Deletion	Insertion	Substitution	Deletion	Insertion	Substitution
WT	uvb3 uvb25		A(3199)	AGGT → T(2351)			TCCA → T(1369)
<i>prrad50</i>	uvb2 uvb23 uvb29						TTGA → A(1809) TCCA → TT(1894) ACCA → T(1650)
<i>ppmre11</i>	uvb3 uvb5						GCTC → T(1813) TCCA → T(1893)
<i>pplig4</i>	uvb4 uvb5 uvb20						TCCA → T(1369) CCGA → A(1576) CCCA → T(1834)
<i>ppku70</i>	uvb1		A(643)				TCCA → TT(1368)

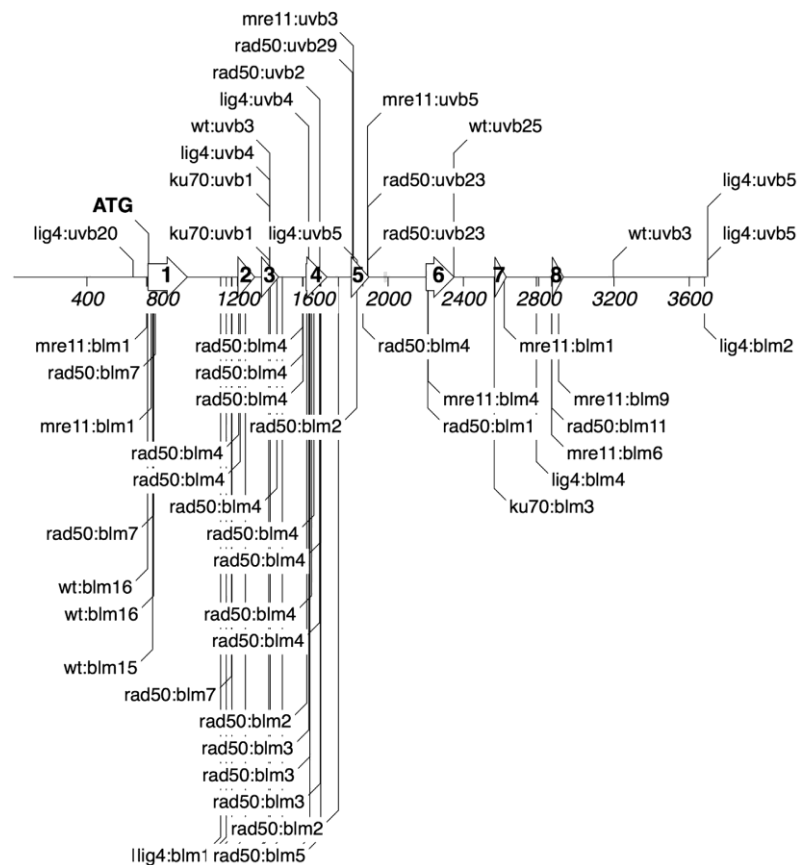


Fig. 3. Map of UVB and Bleomycin induced mutations within the *APT* locus. UVB induced mutations are depicted above and Bleomycin mutations below the schematic drawing of the *APT* locus, with ATG translation start indicated and exons represented as arrows. Mutation types for UVB are generally base substitutions, predominantly transitions in coding regions (Table 1 and Table B.1), whereas Bleomycin induces broad spectra of mutations from base substitutions of both types (transitions and transversions), insertions to deletions, in particular long deletions in *prrad50* and *ppmre11* (Table B.1).

robust mutagenesis via error-prone CPDs and 6-4PPs bypass DNA synthesis. Mutagenic activity is limited to DNA replication within dividing cells. When a mutated cell is not eliminated and mutation is tolerated during further plant development, then due to the clonal character of plant tissue it can initiate a change of phenotype

(with or without external selection pressure). These changes do not need to be recognized as consequence of induced mutation, but rather considered as physiological effect of UVB. In this respect we proved the idea that induced mutagenesis due to unrepaired UV photoproducts could underlie the mechanism of UV impact on

plant phenotype.

Contributions

MH and RV performed *APT* mutation experiments, sequencing and mutation analysis. KJA did comet assay experiments, data evaluation and wrote the manuscript.

Acknowledgements

Supported by Czech Science Foundation (13-06595S) and Ministry of Education, Youth and Sport of CR (LD13006) grants.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.12.013>.

References

- Angelis, K.J., Dusinska, M., Collins, A.R., 1999. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis* 20, 2133–2138.
- Britt, A.B., 1995. Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiol.* 108, 891–896.
- Britt, A.B., Chen, J.J., Wykoff, D., Mitchell, D., 1993. A UV-sensitive mutant of *Arabidopsis* defective in the repair of pyrimidine-pyrimidinone(6-4) dimers. *Science* 261, 1571–1574.
- Chen, J.J., Mitchell, D.L., Britt, A.B., 1994. A light-dependent pathway for the elimination of UV-induced pyrimidine (6-4) pyrimidinone photoproducts in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6, 1311–1317.
- Collins, A.R., 2011. The use of bacterial repair endonucleases in the comet assay. *Methods Mol. Biol.* 691, 137–147.
- Hola, M., Kozak, J., Vagnerova, R., Angelis, K.J., 2013. Genotoxin induced mutagenesis in the model plant *Physcomitrella patens*. *BioMed Res. Int.* 2013, 535049.
- Kamisugi, Y., Schaefer, D.G., Kozak, J., Charlot, F., Vrielynck, N., Hola, M., Angelis, K.J., Cuming, A.C., Nogue, F., 2012. MRE11 and RAD50, but not NBS1, are essential for gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Res.* 40, 3496–3510.
- Menke, M., Chen, L., Angelis, K.J., Schubert, I., 2001. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutat. Res.* 493, 87–93.
- Olive, P.L., Banath, J.P., 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 1, 23–29.
- Pang, Q., Hays, J.B., 1991. UV-b-inducible and temperature-sensitive photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 95, 536–543.
- Rabkin, S.D., Moore, P.D., Strauss, B.S., 1983. In vitro bypass of UV-induced lesions by *Escherichia coli* DNA polymerase I: specificity of nucleotide incorporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 80, 1541–1545.
- Valerie, K., Henderson, E.E., de Riel, J.K., 1985. Expression of a cloned *denV* gene of bacteriophage T4 in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82, 4763–4767.
- Waterworth, W.M., Jiang, Q., West, C.E., Nikaido, M., Bray, C.M., 2002. Characterization of *Arabidopsis* photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation. *J. Exp. Bot.* 53, 1005–1015.
- Waterworth, W.M., Kozak, J., Provost, C.M., Bray, C.M., Angelis, K.J., West, C.E., 2009. DNA ligase 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA single and double strand breaks. *BMC Plant Biol.* 9, 79.

Telomere dynamics in the lower plant *Physcomitrella patens*

Miloslava Fojtová · Eva Sýkorová · Lucie Najdekrová ·
Pavla Polanská · Dagmar Zachová · Radka Vagnerová ·
Karel J. Angelis · Jiří Fajkus

Received: 6 January 2015 / Accepted: 16 February 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract A comparative approach in biology is needed to assess the universality of rules governing this discipline. In plant telomere research, most of the key principles were established based on studies in only single model plant, *Arabidopsis thaliana*. These principles include the absence of telomere shortening during plant development and the corresponding activity of telomerase in dividing (meristem) plant cells. Here we examine these principles in *Physcomitrella patens* as a representative of lower plants. To follow telomerase expression, we first characterize the gene coding for the telomerase reverse transcriptase subunit *PpTERT* in *P. patens*, for which only incomplete prediction has been

available so far. In protonema cultures of *P. patens*, growing by filament apical cell division, the proportion of apical (dividing) cells was quantified and telomere length, telomerase expression and activity were determined. Our results show telomere stability and demonstrate proportionality of telomerase activity and expression with the number of apical cells. In addition, we analyze telomere maintenance in *mre11*, *rad50*, *nbs1*, *ku70* and *lig4* mutants of *P. patens* and compare the impact of these mutations in double-strand-break (DSB) repair pathways with earlier observations in corresponding *A. thaliana* mutants. Telomere phenotypes are absent and DSB repair kinetics is not affected in *P. patens* mutants for DSB factors involved in non-homologous end joining (NHEJ). This is compliant with the overall dominance of homologous recombination over NHEJ pathways in the moss, contrary to the inverse situation in flowering plants.

Miloslava Fojtová, Eva Sýkorová and Lucie Najdekrová have contributed equally to this study.

During manuscript preparation the pre-release of the new moss genome annotation V3.1 was made available at cosmoss.org. Our experimental results define the prediction Pp3c1_42700V1.1 as a correct gene model for the *PpTERT*.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11103-015-0299-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Fojtová · E. Sýkorová · L. Najdekrová · P. Polanská ·
D. Zachová · J. Fajkus (✉)
Faculty of Science and CEITEC – Central European Institute
of Technology, Masaryk University, Kamenice 5, 62500 Brno,
Czech Republic
e-mail: fajkus@sci.muni.cz

M. Fojtová · E. Sýkorová · J. Fajkus
Institute of Biophysics, Czech Academy of Sciences, v.v.i.,
Královopolská 135, 61265 Brno, Czech Republic

R. Vagnerová · K. J. Angelis
Institute of Experimental Botany, Czech Academy of Sciences,
v.v.i., Na Karlovce 1, 16000 Prague 6, Czech Republic

Keywords *Physcomitrella patens* · Telomere maintenance · Telomerase · *PpTERT* structure · DSB repair mutants

Introduction

Telomeres are the conserved terminal domains of linear chromosomes, which are essential for protection of chromosome integrity. Telomeres are chromatin structures and as such they are formed by telomeric DNA and numerous protein components (reviewed in Fajkus et al. 2005). Telomeres serve multiple roles, but their fundamental functions include demarcation of natural chromosome ends to distinguish them from unrepaired chromosome breaks and prevent telomeres from unwanted repair (the so called end-protection problem) (de Lange 2009). Failure in this

function results in chromosome fusions and subsequent genome instability [breakage–fusion–bridge cycle, BFB (McClintock 1941)]. This function is dependent on specific telomeric proteins, as well as the protective secondary structures (such as G-quadruplexes or t-loops) of telomeric DNA itself (de Lange 2009). The second major role of telomeres is to solve the end-replication problem, i.e. to ensure stable maintenance of themselves, as the conventional semiconservative replication is not able to replicate completely the 3'-end of the parental DNA strand synthesized by lagging strand synthesis (Olovnikov 1971). The most common mechanism to counteract this replicative telomere shortening is telomere elongation by a specific ribonucleoprotein complex called telomerase (Greider and Blackburn 1985, 1987). Telomerase replenishes telomeres by a reverse transcription mechanism using its catalytic protein subunit (Telomerase Reverse Transcriptase, TERT) and template RNA subunit (Telomerase RNA, TR) (Greider and Blackburn 1989) for synthesis of tandem repeats of $T_xA_yG_z$ units as TTAGGG in vertebrates or TTTAGGG in most land plants and algae (Sykorova et al. 2003b; Fulneckova et al. 2013).

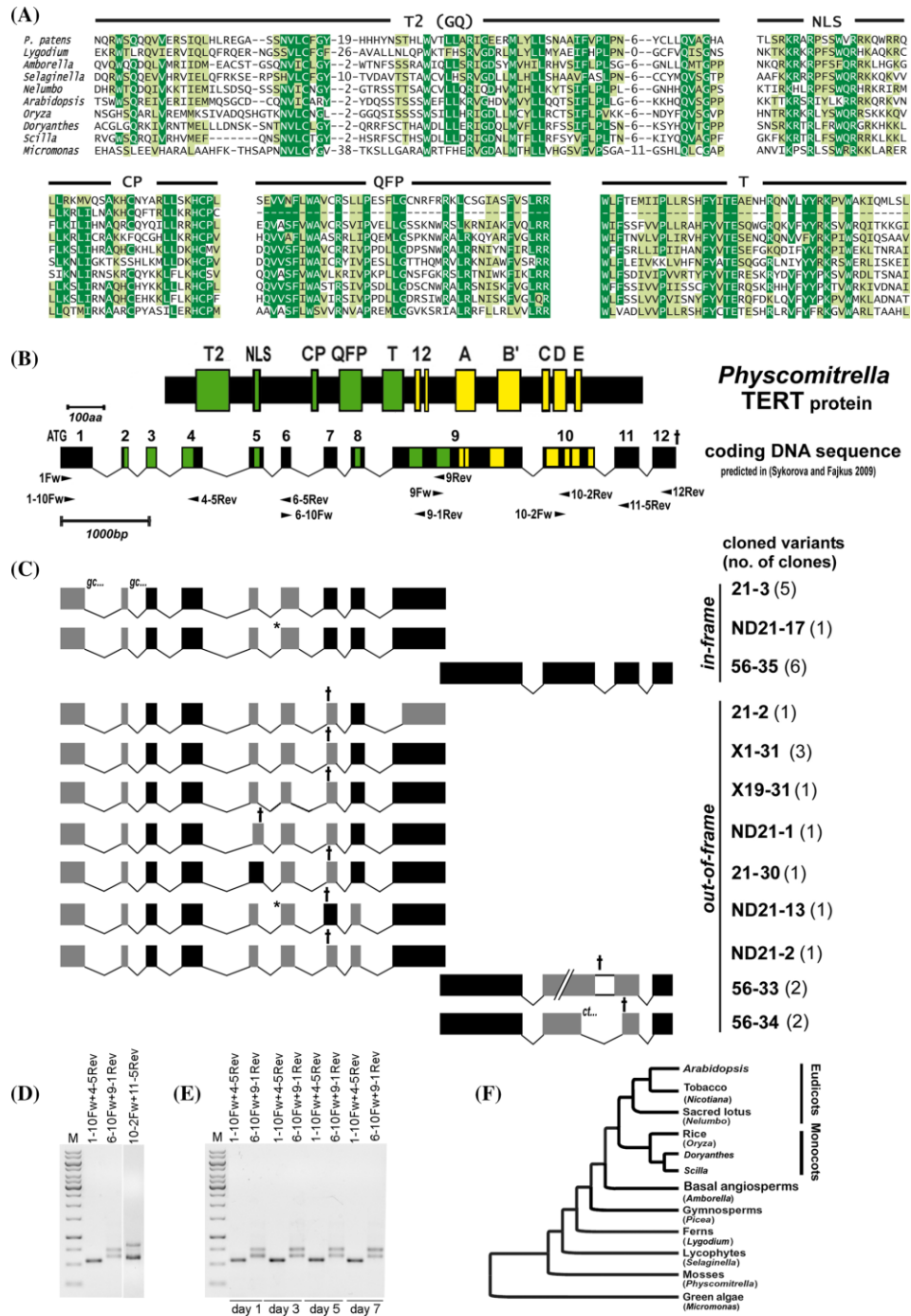
Telomere and telomerase functions are highly conserved among yeasts, protozoans, plants and animals, although exceptions were described which show a telomere sequence different from its phylogenetic position (Sykorova et al. 2003a, b) or even a different (telomerase-independent) mechanism of telomere synthesis (Pich et al. 1996; Sykorova et al. 2006a). In plants, telomere biology has been studied mostly in classical model species such as *Arabidopsis thaliana* or *Nicotiana tabacum* (Fajkus et al. 1995, 1996; Fitzgerald et al. 1996) and compared to flowering plants, much less information is available in lower plants like moss and algae species (Suzuki 2004; Shakirov et al. 2010; Fulneckova et al. 2012, 2013).

Physcomitrella patens is a species of moss (bryophytes) which is a basal lineage of land plants, having diverged before the acquisition of well-developed vasculature (Fig. 1f). As the oldest living branch in land plant evolution, it stands in an important phylogenetic position for comparative studies to illuminate the evolution of the mechanisms behind the complexity of modern plants, including model organisms, such as *Arabidopsis*, and crop plants (Rensing et al. 2008). The body plans of all land plants are shaped through the actions of apical meristems, tissues composed of self-renewing stem cells that provide daughter cells for subsequent differentiation (Graham et al. 2000; Friml et al. 2006; Benkova et al. 2009) and some common pathways of apical meristem regulation may be conserved between ancestral plants and present day mosses (Prigge and Bezailla 2010; Viaene et al. 2014).

Unlike its 450 million years younger land plant relatives, *Physcomitrella* is one of a few known multicellular

Fig. 1 PpTERT protein, gene, expression and mRNA splicing variants. **a, b** The *Physcomitrella* (Bryophytes) telomerase reverse transcriptase (TERT) subunit comprises conserved N-terminal telomerase specific regions [T2(GQ), NLS, CP, QFP, T] and reverse transcriptase motifs (1, 2, A–E) similar to other TERTs. The predicted PpTERT coding DNA sequence (**b**) from the start (ATG) to the stop (†) codon was revised and detailed analysis of cloned cDNA sequences (**c**) confirmed the existence of 12 exons in the *PpTERT* gene and a high number of splicing events leading mostly to out-of-frame variants with premature stop codons. Detailed RT-PCR analysis (primer positions shown in **b**) and sequencing of purified RT-PCR products (representative combinations obtained in RNA from 7 day protonemata shown in **d**) demonstrated the major splicing pattern in the exon 1–4 region (1–10Fw and 4–5Rev primers) which confirms data from all cloned cDNA sequences. In addition, the presence of two abundant mRNA variants corresponding to the in-frame representative clone 21–3 and the out-of-frame representative clone X1–31 (compare primer combination 6–10Fw and 9–1Rev in **d**) was revealed during protonema development (**e**). The major splicing variant of the 3' region is represented by the in-frame clone 56–35. Besides that, a low abundance of the out-of-frame variant 56–33 was observed (10–2Fw and 11–5Rev primers, shown in **d**). Phylogeny position of *Physcomitrella* (**f**) as a basal plant lineage indicates that its 12 exon TERT structure as ancestral to plant telomerase TERT genes. An overview of land plant phylogeny including the relationship among major lineages of angiosperms was adapted and modified from (Albert et al. 2013) (scientific names in parentheses). **a** Aligned sequences (phylogeny relationship shown in **f**) were (i) experimentally verified TERT sequences from *Arabidopsis* (Genbank AAD54276.1), rice (*Oryza sativa*, AAM21641.1), *Doryanthes excelsa* (AAX19887.1), *Scilla peruviana* (both Asparagales, AAX21217.1); (ii) transcriptome isotig from fern (*Lygodium japonicum*, isotig24217, <http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/kanikusaf/>) (iii) predicted TERT sequences from green alga (*Micromonas* sp. RCC299, Mamiellales, Genbank XP_002505190.1), sacred lotus (*Nelumbo nucifera*, Proteales, Genbank XP_010257254.1); (iv) revised TERT prediction from *Amborella trichopoda* (basal Magnoliophyta, AmTr_v1.0_scaffold00007, NW_006498404) and *Selaginella moellendorffii* (Lycopodiidae, SELMOscaffold_16, NW_003314277). **b** Positions of telomerase specific motifs are highlighted in the PpTERT protein and predicted coding DNA sequence. **c** Cloned cDNA sequences (clone names on right with the number of corresponding sequenced clones given in brackets) show usage of the alternative splice donor sites (*gc...*, *ct...*), and a high number of splicing events either corresponding (black) or not corresponding (grey) to predicted exon–intron borders illustrated in part (**b**). The alternative splice donor site in exon 6 (*) was found in two clones and it differs in three nucleotides from the major splice site

organisms with a highly efficient system of homologous recombination (Schaefer 2002; Kamisugi et al. 2006). Consequently, gene targeting in *Physcomitrella* is five orders of magnitude more efficient than in angiosperms and two orders of magnitude more efficient than in mouse embryonic stem cells, thus being comparable with that observed in *Saccharomyces cerevisiae* (Kamisugi et al. 2006). In contrast to seed plants, the dominating generation in the moss life cycle is the haploid gametophyte and the regenerating moss filaments (protonemata) can be directly assayed using PCR methods without complex back-crosses (Kamisugi et al. 2006; Smidkova et al. 2010).



In this paper, we take advantage of the use of *P. patens* to perform a comparative investigation of telomere dynamics between this species representing lower plants, and flowering plants. In contrast to animals, telomerase is not developmentally silenced during embryogenesis in flowering plants, but remains active throughout entire plant life in dividing meristem cells (Fajkus et al. 1996; Fitzgerald et al. 1996). This results in the absence of replicative telomere shortening during individual plant development in contrast to animals (Fajkus et al. 1998; Riha et al. 1998). However, experimental support for these conclusions has been only indirect so far since plant samples used for telomere and telomerase analyses always contain unknown proportions of meristem cells in great excess of other cells. In contrast, the filaments of *P. patens* protonema grows by apical cell division and represents a perfect cell-lineage and, therefore, plant development can be pinpointed to the differentiation of a single cell. Most importantly, the percentage of apical cells can be quantified exactly, depending on the days of protonema cultivation (total cell number) and the level of protonema branching, and thus it is possible to tackle the telomere and telomerase dynamics experimentally. To do this, we characterise here the gene coding for telomerase reverse transcriptase, *PpTERT*, in *P. patens* that we have predicted previously from genome sequencing data (Sykorova and Fajkus 2009). We further perform analyses of *PpTERT* expression, telomerase activity and telomere lengths, in samples with a varying percentage of apical cells during protonema growth. Finally, we examine telomerase activity and telomere lengths in selected mutants for DNA repair factors which are potentially involved in *P. patens* telomere structure, function and maintenance, as inferred from the corresponding results obtained in land plants.

Materials and methods

Plant material

Physcomitrella patens (Hedw.) B.S.G. “Gransden 2004” wild type and the mutants *pprad50*, *ppmre11*, *ppnbs1* and *pplig4* were described previously (Kamisugi et al. 2012; Hola et al. 2013). The *pplig4* and *ppku70* mutants in the C-NHEJ repair pathway were generated by D. G. Schaefer, Neuchatel University, Switzerland and F. Nogue, INRA, Paris, France as gene replacement mutants, and were kindly provided to us by the authors.

Cultivation of *P. patens*

P. patens wild type and mutants were propagated vegetatively as described by (Knight et al. 2002). Individual plants

were cultured as ‘spot inocula’ on BCD agar medium supplemented with 1 mM CaCl₂ and 5 mM ammonium tartrate (BCDAT medium), or as lawns of protonemal filaments by subculture of homogenized tissue on BCDAT agar medium overlaid with cellophane discs (Focus Packaging & Design, UK) in growth chambers with 18/6 h day/night cycle at 22/18 °C.

For subculture and preparation of 1-day-old protonemal tissue, 1-week-old tissue scraped from plates was suspended in 8 mL of BCD medium and sheared by a T25 homogenizer (IKA, Germany) at 24,000 rpm for two 1-minute cycles and let 24 h to recover in a cultivation chamber with gentle shaking at 100 rpm. This treatment yielded a suspension of 3–5 cell protonema filaments, which readily settle for recovery. Settled protonemata could be handled without excessive losses by tweezers on Petri plates.

Counting of apical cells in *P. patens* branching culture

Cells cultivated on agar plates were counted manually by eye using a stereoscopic binocular light microscope (Olympus SZX16 research stereo microscope), and the field in sharp focus was evaluated on a computer monitor. Only objects in the focused area were included for counting. Specific fields were selected randomly across the plate, and usually areas with a lower density of cells were considered. Cells were counted on ten independent plate sections containing 25–204 cells for each time period using four independently grown cultures.

Cloning and analysis of *PpTERT* gene structure

Total RNA was isolated from *P. patens* cultures using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) followed by DNaseI treatment (TURBO DNA-free, Applied Biosystems) according to the manufacturers’ instructions. cDNA was prepared by reverse transcription of 1 µg of RNA using M-MuLV reverse transcriptase (NEB) and Random Nonamers (Sigma). The predicted *PpTERT* gene sequence (Sykorova and Fajkus 2009) was used for designing specific primers and cloning of the cDNA sequence (Table S1, Fig. 1 b). RT-PCR conditions for primer combinations (1Fw or 1–10Fw and 9Rev primers, 9Fw and 12Rev primers, Table S1) were optimized using gradient PCR and the *PpTERT* sequences were amplified with *DyNAzyme* II DNA Polymerase (Finnzymes) as follows: 2 min of initial denaturation and 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 57 °C and 90 s at 72 °C. Sequences covering the overlapping cDNA regions (exons 1–9 and exons 9–12, GenBank KM886460–KM886468, KP001262, KP091459) were cloned, sequenced and manually aligned on the predicted *PpTERT* gene sequence (Sykorova and Fajkus 2009). The

prevailing splicing pattern of the *PpTERT* transcripts was verified by sequencing of the RT-PCR products spanning regions with frequent alternative splicing sites (see below, Table S1, Fig. 1c). The PpTERT protein sequence was examined for the presence of conserved motifs and manually aligned to the experimentally verified plant TERT sequences of *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Doryanthes excelsa*, and *Scilla peruviana* (see (Sykorova and Fajkus 2009) for review), and to predicted sequences from the transcriptome of *Lygodium japonicum* (Aya et al. 2015) and the genome scaffolds of *Selaginella moellendorffii* (Banks et al. 2011), *Amborella trichopoda* (Albert et al. 2013), *Nelumbo nucifera* (Ming et al. 2013) and the prasinophyte alga *Micromonas* sp. RCC299 (Worden et al. 2009).

Analysis of the *PpTERT* gene transcripts

Quantification of the *PpTERT* transcript levels was done using FastStart SYBR Green Master (Roche) and primers derived from the exon 10 coding for the reverse transcription domain of the protein (Table S1); ubiquitin was chosen as a reference gene (Harries et al. 2005). One microliter of 2× diluted cDNA (see above) was added to the 20 μl reaction mix, and the final concentration of each forward and reverse primer was 0.25 μM. Reactions were done in triplicates; the PCR cycling consisted of 15 min of initial denaturation followed by 40 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 56 °C and 30 s at 72 °C. At least two biological replicates in two technical replicates were analysed. Relative *TERT* transcription was calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method (Pfaffl 2004). Additional RT-PCR experiments were performed to verify exon/intron structure of the *PpTERT* gene and the presence of mRNA variants during development.

Analysis of telomerase activity (TRAP—telomere repeat amplification protocol)

In vitro analysis of telomerase activity is based on the elongation of a substrate primer by the telomerase, and the extension product is then amplified by PCR. A telomerase extract from *P. patens* cultures was prepared as previously described (Fitzgerald et al. 1996; Sykorova et al. 2003a), and the maximum of telomerase activity was detected in fractions precipitated by 7.5–10.0 % PEG 8000. The quantitative version of the TRAP assay was performed according to (Herbert et al. 2006) using FastStart SYBR Green Master (Roche) and TS21 substrate primer and TelPr reverse primer (Table S1). Samples were analysed in triplicates in a 20-μl reaction mix, and at least two biological replicates (independently grown cultures) were evaluated.

Relative telomerase activity was calculated by the ΔC_t method (Pfaffl 2004).

Analysis of telomere lengths

Analysis of telomere lengths by the Terminal Restriction Fragments (TRF) method is based on the digestion of genomic DNA by a frequently cutting restriction endonuclease without a recognition site in the G-rich telomeric repeats. After hybridization with a radioactively labeled telomeric probe, the signal corresponds to non-digested telomeric tracts (plus subtelomeric regions up to the first restriction site upstream of the telomeres). Analysis was performed as previously described (Ruckova et al. 2008; Jaske et al. 2013). Briefly, a *P. patens* culture was homogenized in liquid nitrogen, DNA was isolated according to (Dellaporta et al. 1983) and digested by either *MseI* or *TaqI* restriction enzymes. Southern hybridization was performed with a telomeric probe synthesized as described in (Ijdo et al. 1991). Signals were visualized on a FLA7000 phosphorimager (FujiFilm). Evaluation of fragment lengths was done by using the Gene Ruler 1-kb DNA Ladder (Fermentas) as a standard; hybridization patterns were analysed by Multi Gauge software (FujiFilm). The unweighted mean telomere length was calculated as $\sum(OD_i \times L_i) / \sum(OD_i)$, where OD_i is the signal intensity above background within interval i and L_i is the molecular weight (kb) at the midpoint of interval i .

Analysis of induced DNA double strand breaks (DSBs) and of their repair in *P. patens*

Bleomedac inj. (Medac, Hamburg, Germany) was used for Bleomycin treatment as previously described (Hola et al. 2013). One day regenerated protonemal tissues (>50 % of apical cells) from wild type and mutant lines were treated with Bleomycin for 1 h prior to nuclear extraction and analysis. DSBs were detected by a comet assay using a fully neutral N/N protocol (Olive and Banath 2006; Rensing et al. 2008; Kozak et al. 2009). Comets were stained with SYBR Gold (Molecular Probes/Invitrogen), viewed in epifluorescence with a Nikon Eclipse 800 microscope and captured and evaluated by the LUCIA Comet cytogenetic software (LIM Inc., Czech Republic). The fraction of DNA in comet tails was used as a measure of DNA damage and for calculation of the percentage of DSBs remaining (Kozak et al. 2009). Data in this study were obtained in at least three independent experiments. Measurements of blindly labeled comet slides included four independent gel replicas of 25 evaluated comets with a total of at least 300 comets analyzed per experimental point.

Results and discussion

Structure of *PpTERT* gene

In order to track a possible involvement of telomerase expression in *P. patens* telomere dynamics, we analysed *P. patens TERT* gene structure and transcription. According to the *P. patens* genome annotation v1.6 (Rensing et al. 2008), the *PpTERT* gene sequence was predicted in silico with only three exons covering the C-part of the PpTERT protein thus possibly missing specific N-terminal telomerase motifs. Taking advantage of our knowledge about *TERT* gene structure and possible mRNA splicing (Rensing et al. 2005) we predicted 12 exons in the *PpTERT* gene (6971 bp long, inside contig ABEU01012720 (Sykorova and Fajkus 2009), Fig. 1b) similarly to other known plant *TERT* genes. To verify the predicted *PpTERT* gene and mRNA structure, we cloned cDNA sequences to cover the entire *PpTERT* (GenBank KM886460–KM886468, KP001262). Our gene structure prediction differed from the experimental results only in details, e.g. alignments of cloned *PpTERT* sequences revealed that exons 1 and 2 used the alternative splice donor site GC (Fig. 1c) instead of the consensus splice site GT reported in *Physcomitrella* transcriptome analysis (Rensing et al. 2005). This splicing pattern was found in all cloned cDNA sequences (Fig. 1c) and confirmed by sequencing of RT-PCR products spanning exon 1–4 (Fig. 1b, d, e). The exon lengths and cDNA sequence also correspond to the EST sequence (Genbank CN203080) covering exons 1–4 of the putative *TERT* of the bryophyte *Syntricha ruralis*. Moreover, we identified a surprisingly high number of alternative splicing events in *PpTERT*. These comprise different combinations of alternative donor and acceptor sites, especially in the 5' region of the *PpTERT* transcript, and retention of the intron 10 (Fig. 1c). Variation between the predicted and the cloned *PpTERT* cDNA sequences originated mostly from alternative splicing of exons 5–7 that code for a non-conserved protein linker between the nuclear localisation signal (NLS) and CP telomerase motifs. Majority of identified splicing events lead to out-of-frame mRNA variants (Fig. 1c). The high number of identified alternative transcripts necessitated a detailed analysis of major splicing patterns via sequencing of RT-PCR products that span exons 1–4, 1–6, 4–7, 7–9 and 9–12 (Table S1, Fig. 1b, d). For the 5' region of *PpTERT*, the results verified the presence of two major variants (Fig. 1b–d, primer combination 6–10Fw and 9–1Rev) found in the representative clone 21–3 (in-frame variant, Genbank KM886462) and in the representative clone 31–X1 (out-of-frame, premature stop codon in exon 7). Sequencing of RT-PCR products for the 3' region of *PpTERT* showed the presence of a major variant 56–35 (in-frame, Genbank KM886460) in addition to a low abundance variant 56–33 (out-of frame, premature stop codon in intron 10) (Fig. 1b–d, primer combination 10–2Fw and 11–5Rev). The

major mRNA splicing represented by in-frame variant clone 56–35 was also verified with the EST sequences from the GENBANK database (Unigene ID: 2850076).

Analysis of the PpTERT protein sequence (1301 AA, 148 kDa, pI 9.371) clearly showed the presence of all telomerase specific motifs (Fig. 1a) including the conserved NLS motif and highly conserved regions in the C-terminal extension similar to other plant TERTs (Sykorova et al. 2006a, b; Sykorova and Fajkus 2009). To compare telomerase structure from evolutionary distinct plant groups we analyzed a representative set comprising eudicots (*Arabidopsis*, sacred lotus), monocots (rice, *Doryanthes*, *Scilla*), basal angiosperm (*Amborella*), fern (*Lygodium*), lycophyte (*Selaginella*) and green alga (*Micromonas*). The experimentally verified sequences and the *Lygodium* isotig derived from transcriptome data were used for prediction or improvement of predicted TERT gene and protein structures (Fig. 1a). For example, analysis of the predicted *Amborella TERT* sequence revealed a misannotated gene structure and analysis of the corresponding genome scaffold clearly showed the presence of 12 exons similarly to the prediction from *Selaginella* scaffold 16, and the predicted *Nelumbo TERT*. Together with the presented *Physcomitrella TERT* data, these results suggest a 12 exon gene structure for an ancestral plant *TERT* (Fig. 1f) and also emphasize the necessity of experimental verification of predicted *TERT* gene structures.

RT-PCR analysis of *PpTERT* mRNA variants during development

The spectrum of *PpTERT* alternative splicing events is in agreement with the moss genome re-annotation that was reported after implementation of *Physcomitrella* transcriptome data (Zimmer et al. 2013) confirming intron retention as the most frequent form (~40 %) among gene loci with alternate transcripts (~21 % of all genes). However, its abundance in a single gene is quite unusual—for example, alternative *TERT* transcripts amount to only a few per cent in *Arabidopsis* (Zachova et al. 2013). The almost equal representation of in-frame and out-of-frame *PpTERT* variants during protonema development (Fig. 1e) may be of functional relevance, possibly related to the haploid protonema status. To our knowledge, equimolar representation of more *TERT* gene variants was only detected in the polyploid species *Nicotiana tabacum*, where three sequence variants of the *TERT* gene derived from the progenitor *N. tomentosiformis* and *N. sylvestris* genomes were identified (Sykorova et al. 2012). However, even in this case the level of the pseudogene *TERT* variant transcript was negligibly low (close to the detection limit). Potential translation of the out-of-frame *PpTERT* variant would lead to a protein comprising the N-terminal telomerase domain similar to the

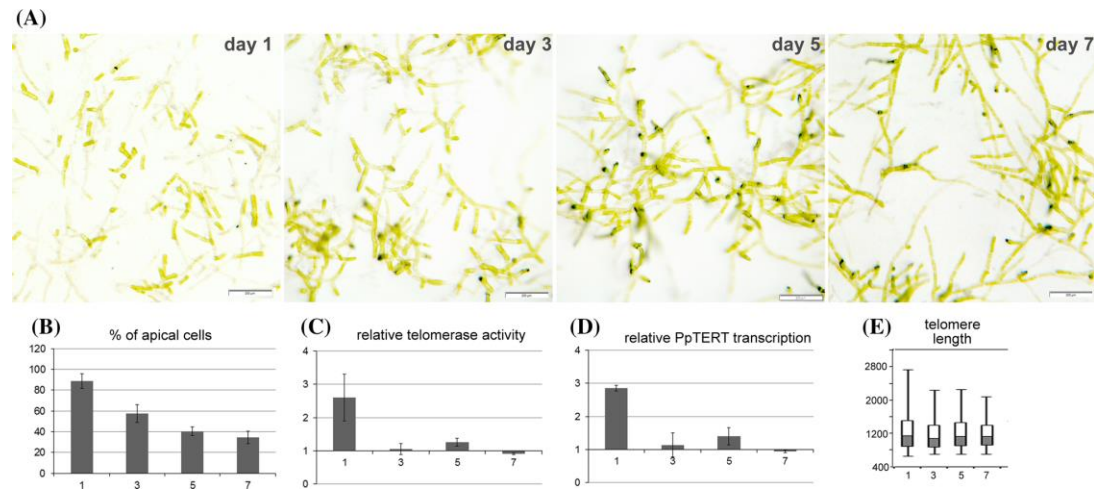


Fig. 2 Telomere dynamics in *P. patens* protonema. **a** Morphology of *P. patens* cells, **b** percentage of apical cells, **c** telomerase activity, **d** *PpTERT* gene transcription, and **e** telomere lengths in the course of 7-day culturing. A 7-day old culture was mechanically disrupted to destroy branched cells chains and cultivated under standard conditions. Samples were taken in 1, 3, 5 and 7 days after sub-culturing for respective analyses. Telomerase activity and *TERT* gene transcription

were related to the values obtained for a 7-day culture. The length of telomeres is presented using a *box-and-whisker* plot where the bottom part (*gray*) and the top (*white*) of the *box* are the lower and upper quartiles, respectively, separated by the median. The ends of the *whiskers* represent the minimum and maximum length corresponding to the hybridization signal range. Analyses were performed using three independently grown cultures

Arabidopsis TERT V(I8) variant. This variant interacts with POT1a, one of the paralogs of POT1 (Protection of Telomeres 1), a single-stranded-DNA-binding protein (Rosignol et al. 2007) and was suggested to provide additional telomerase function and regulation (reviewed in Majerska et al. 2011). Since *P. patens* also harbours a gene coding for POT1 protein (only a single-copy) and, moreover, its role for telomere integrity has already been demonstrated (Shakirov et al. 2010), this hypothesis is plausible.

Telomere dynamics during protonema growth

When sub-culturing the *P. patens* protonemata, highly branched chains of cells were mechanically disrupted and transferred to fresh medium; during the growth phase, the protonemata lengthened and divided forming branched chains. Since in higher plants telomerase is active in organs and tissues containing dividing meristem cells (seedlings, root tips, blossoms, floral buds), we monitored the percentage of apical cells in a growing *P. patens* culture and correlated this parameter to the telomerase activity, *PpTERT* transcript levels, and telomere length. One day after sub-culturing, the level of apical cells was highest and decreased relatively sharply during the subsequent 2 days, while a further drop was significantly slower (Fig. 2a, b). Telomerase activity and *PpTERT* gene transcripts increased moderately but reproducibly in the first day after the sub-culturing (Fig. 2c, d), when about 85 % of

the cells were located at the chain termini (Fig. 2b). In the following time intervals, telomerase activity and *PpTERT* transcripts were at the level comparable to standard 7-day-old culture which was used as the source culture. Importantly, the accrual of telomerase activity and transcription after sub-culturing was not correlated with a possible stress connected to the mechanical disruption of protonemata; telomerase activity and transcription in the 7-day-old culture collected from the plate and the same culture after mechanical treatment were quite comparable (data not shown). Telomere lengths were stable during the *P. patens* protonema culturing (Fig. 2e, Fig. S1) which accords with the results obtained in higher plants where telomere lengths are preserved in all tissues throughout development (Fajkus et al. 1998; Riha et al. 1998). Based on these results, telomerase activity and expression correlates with the proportion of apical cells in a protonema culture and telomere lengths remain stable during 7-day culturing in *P. patens*. We conclude that our results provide a direct experimental support of the general validity of the key principles of telomere dynamics during plant development which so far have only been predicted.

Telomere maintenance in *P. patens* mutants in selected DSB repair factors

In the *Arabidopsis thaliana* model plant, telomere homeostasis was shown to be disrupted in mutants with loss of

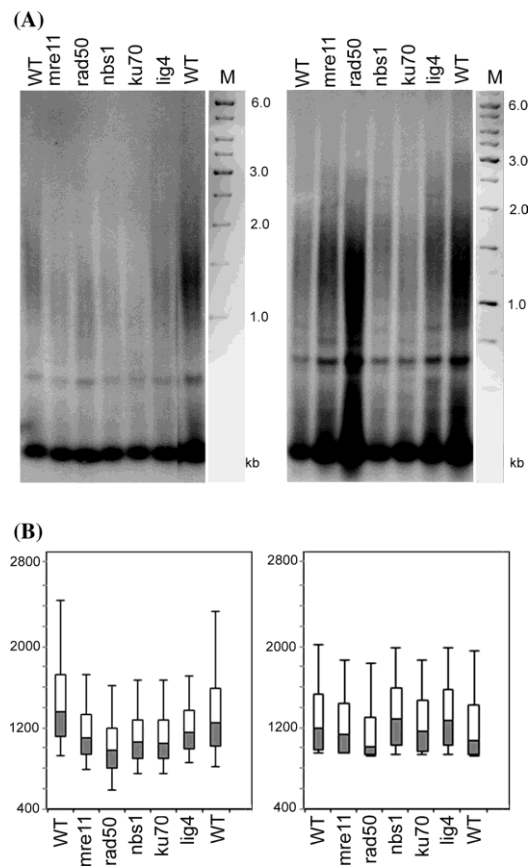


Fig. 3 Telomere length in *P. patens* mutants. The length of telomeric repeats was assayed by the TRF protocol in 7-day old cultures (two biological replicates are shown). **a** After hybridization of DNA digested by a restriction endonuclease against the telomeric probe, the radioactive signals in mutant lines reflecting the length of telomeres were either slightly shifted towards shorter lengths compared to wild type (WT) samples (*left*) or were maintained at the wild type level (*right*). Five independent analyses of telomere length were performed, and representative results are presented. **b** Hybridization signals were evaluated by MultiGauge software (Fujifilm) and are presented using a *box-and-whisker* plot as described in Fig. 2

function of genes coding for proteins involved in repair and recombination processes (see below). Although one of the crucial functions of telomeres is prevention of aberrant recombination events at the chromosome termini, proteins participating in recombination are essential for proper telomere structure and functions and are even involved in alternative mechanisms of telomere lengthening (Draskovic et al. 2009; Amiard et al. 2011). We took advantage of the extremely efficient system of homologous recombination in *P. patens* (Schaefer 2002) which enables relatively

simple and highly effective targeting of any non-essential gene, and analyse telomere length, telomerase activity and transcription of the *PpTERT* gene in mutant lines as follows: (i) In mutants in genes of the MRN complex (*mre11*, *rad50*, *nbs1*) which is involved in recognition of DSBs in DNA and subsequent phosphorylation signalling. Vertebrate cells with *MRE11* gene loss of function are even not viable, but in *A. thaliana* telomere lengthening was observed and mutants were hypersensitive to DNA damaging agents and suffered from developmental defects (Bundock and Hooykaas 2002). Similarly, RAD50 function is essential for telomere maintenance in *A. thaliana*; in plants with a T-DNA insertion in the *AtRAD50* gene a significant telomere shortening and meiotic and DNA repair defects were observed (Gallego and White 2001). Finally, *A. thaliana nbs1* mutants are without morphological defects and telomere length is at the wild type level, but in *nbs1/tert* double-mutants telomere erosion was more progressive compared to *tert* mutants suggesting interplay of NBS1 and telomerase in telomere homeostasis processes (Najdekrova and Siroky 2012). (ii) In a *ku70* mutant; KU70 protein is a part of the KU70/KU80 complex which binds and stabilizes DSBs. In *Arabidopsis*, KU70 loss led to the formation of extra-long telomeres, elongation of single-strand telomere overhangs and significantly increased level of telomeric circles (Riha et al. 2002; Gallego et al. 2003; Akimcheva et al. 2008). (iii) In a *lig4* mutant with loss of function of the major DNA ligase participating in non-homologous end joining. In *Arabidopsis*, telomeres in *lig4* mutant are more heterogeneous but have the same average length as wild type telomeres (Heacock et al. 2007).

In the *P. patens* mutants tested, telomerase activity and *TERT* gene transcripts assayed by quantitative approaches do not significantly differ from the values obtained for wild type cultures (not shown). Interestingly, lengths of telomeres in mutants, including *ku70* mutant, are similar to the wild type telomeres, and no significant changes were observed (Fig. 3, Fig. S2). Basic telomere protective functions appear to be preserved as well, as suggested by unchanged morphology and growth parameters of mutant cultures (results not shown). Altogether, malfunction of the proteins examined involved in repair and recombination pathways does not influence telomere homeostasis substantially in *P. patens*, in contrast to the common higher plant model *Arabidopsis thaliana* (Table 1). The striking absence of a telomeric phenotype in *ku70* and other mutants in NHEJ factor genes in *P. patens* presumably corresponds to the general dominance and higher efficiency of homologous recombination over NHEJ in this system, contrasting with the opposite situation in flowering plants. These results further suggest that KU70 is not directly involved in protection of telomeres in *P. patens*, contrary to the situation described in *A. thaliana* (Kazda et al. 2012).

Table 1 Comparison of the telomere phenotype in mutants with loss of function of genes involved in the DNA DSB repair pathways in plant models *A. thaliana* and *P. patens*

Mutant	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
<i>mre11</i>	Elongated telomeres ^a	No significant changes in telomere lengths
<i>rad50</i>	Shortened telomeres ^b	No morphological or growth defects in protonema cultures
<i>nbs1</i>	WT morphology and telomere length, in <i>nbs/tert</i> more progressive telomere erosion than in <i>tert</i> mutants ^c	
<i>ku70</i>	Extra long telomeres ^d	
<i>lig4</i>	Length of telomeres heterogeneous ^e	

^a Bundock and Hooykaas (2002); ^b Gallego and White (2001); ^c Najdekrova and Siroky (2012); ^d Riha et al. (2002), Gallego et al. (2003) and Akimcheva et al. (2008); ^e Heacock et al. (2007)

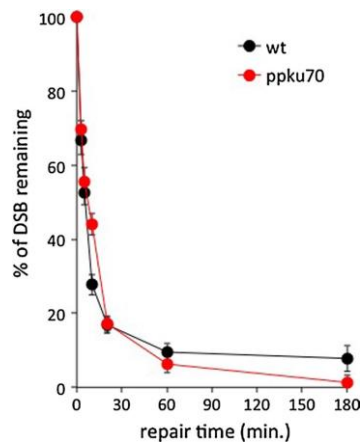


Fig. 4 DSBs repair kinetics determined by comet assay. One day regenerated protonemal tissue from wild type and *ku70* mutant lines was treated with 30 μ g/ml Bleomycin for 1 h prior to nuclear extraction and analysis. DSBs were determined by the N/N protocol: *black*—wild type, *red*—*ku70*. Repair kinetics is plotted as % of DSBs remaining after 0, 3, 5, 10, 20, 60 and 180 min period of repair. Maximum damage is normalised as 100 % at $t = 0$ for both lines. *Error bars* show standard error

Repair kinetics of DSBs in *ku70* mutants

In order to assess the interpretation of the surprising absence of a telomeric phenotype in *ku70* mutants, DNA repair kinetics were analysed in these mutants. The results of comet assays demonstrate (Fig. 4) that inactivation of the C-NHEJ pathway in *P. patens* by knocking out the *KU70* gene, whose product is responsible for DSB recognition, does not affect the overall ability to repair DSBs. Similarly mutations of *LIG4* (Holla et al. 2013), a factor involved in the final step of C-NHEJ, and of *MRE11*, *RAD50* and *NBS1*, components of the key repair complex MRN involved in both NHEJ and homologous recombination pathways (Kamisugi et al. 2012), do not affect overall DSB

repair in *P. patens* apical cells. In this respect, the moss *P. patens* parallels the situation in *Arabidopsis* where mutants of *KU80* and *LIG4* also efficiently repair DSBs (Kozak et al. 2009; Amiard et al. 2010; Charbonnel et al. 2010, 2011) but in contrast to *Physcomitrella*, the *Arabidopsis* mutants repair DSBs during the 1st phase even faster than wt Col0 (Kozak et al. 2009). Thus, *P. patens* wild type and mutants used in these studies exercise efficient and rapid DSB repair that in the case of deprotected telomeres can detect them as substrates for joining. However, the absence of a telomere phenotype in the corresponding *P. patens* mutants suggests that the loss of neither of these factors results in telomere deprotection.

Conclusion

We report here on the characterisation of *PpTERT* gene and its major splicing variants in growing protonemata. The overall *PpTERT* exon structure and the arrangement of telomerase-specific functional motifs in the amino acid sequence is conserved with respect to the previously characterised plant *TERTs*. A surprisingly rich spectrum and high abundance of alternate splicing products was observed and subsequent studies should address their functional importance. Further, we investigated telomere maintenance in growing *P. patens* protonemata and our results demonstrate telomere length stability and association of telomerase activity and expression with dividing apical cells. These findings provide experimental evidence for previously anticipated principles governing plant telomere biology and suggest their general validity among both lower and land plants. Next, we examined *P. patens* mutants in DSB repair factors for a possible telomere phenotype. Particularly interesting is the absence of a telomere phenotype in mutants depleted of *KU70*, the key factor in NHEJ, whose absence in *Arabidopsis* results in extremely elongated telomeres. Our results suggest that contrary to the situation in *A. thaliana*, *KU70* is not essential for protection of

telomeres in *P. patens*. Thus, our study identifies both conserved and distinct features between the telomere biology of lower and land plants which may initiate further studies directed to deeper understanding of their strategies to protect genome integrity.

Acknowledgments This work was supported by the Czech Science Foundation (13-06595S), project CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) of the European Regional Development Fund and project EVOGEN (CZ.1.07/2.3.00./20.0189) co-financed from European Social Fund and the State Budget of the Czech Republic.

References

- Akimcheva S, Zellinger B, Riha K (2008) Genome stability in Arabidopsis cells exhibiting alternative lengthening of telomeres. *Cytogenet Genome Res* 122:388–395. doi:10.1159/000167827
- Albert VA et al (2013) The Amborella genome and the evolution of flowering plants. *Science* 342:1467. doi:10.1126/science.1241089
- Amiard S, Charbonnel C, Allain E, Depeiges A, White CI, Gallego ME (2010) Distinct roles of the ATR kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the maintenance of chromosomal stability in Arabidopsis. *Plant Cell* 22:3020–3033. doi:10.1105/tpc.110.078527
- Amiard S, White C, Gallego ME (2011) Recombination proteins and telomere stability in plants. *Curr Protein Pept Sci* 12:84–92
- Aya K, Kobayashi M, Tanaka J, Ohyanagi H, Suzuki T, Yano K, Takano T, Yano K, Matsuoka M (2015) De novo transcriptome assembly of a fern, *Lygodium japonicum*, and a web resource database, Ljtrans DB. *Plant Cell Physiol* 56:e5. doi:10.1093/pcp/pcu184
- Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M et al (2011) The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332:960–963. doi:10.1126/science.1203810
- Benkova E, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Dubrovsky JG (2009) A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? *Trends Plant Sci* 14:189–193. doi:10.1016/j.tplants.2009.01.006
- Bundock P, Hooykaas P (2002) Severe developmental defects, hypersensitivity to DNA-damaging agents, and lengthened telomeres in Arabidopsis MRE11 mutants. *Plant Cell* 14:2451–2462. doi:10.1105/TPC.005959
- Charbonnel C, Gallego ME, White CI (2010) Xrcc1-dependent and Ku-dependent DNA double-strand break repair kinetics in Arabidopsis plants. *Plant J* 64:280–290. doi:10.1111/j.1365-3113X.2010.04331.x
- Charbonnel C, Allain E, Gallego ME, White CI (2011) Kinetic analysis of DNA double-strand break repair pathways in Arabidopsis. *DNA Repair (Amst)* 10:611–619. doi:10.1016/j.dnarep.2011.04.002
- de Lange T (2009) How telomeres solve the end-protection problem. *Science* 326:948–952. doi:10.1126/science.1170633
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A Plant DNA miniprep. Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19–21
- Draskovic I, Arnoult N, Steiner V, Bacchetti S, Lomonte P, Londono-Vallejo A (2009) Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15726–15731. doi:10.1073/pnas.0907689106
- Fajkus J, Kovarik A, Kralovics R, Bezdek M (1995) Organization of telomeric and subtelomeric chromatin in the higher plant *Nicotiana tabacum*. *Mol Gen Genet* 247:633–638. doi:10.1007/Bf00290355
- Fajkus J, Kovarik A, Kralovics R (1996) Telomerase activity in plant cells. *FEBS Lett* 391:307–309
- Fajkus J, Fulneckova J, Hulanova M, Berkova K, Riha K, Matyasek R (1998) Plant cells express telomerase activity upon transfer to callus culture, without extensively changing telomere lengths. *Mol Gen Genet* 260:470–474
- Fajkus J, Sykorova E, Leitch AR (2005) Telomeres in evolution and evolution of telomeres. *Chromosome Res* 13:469–479. doi:10.1007/s10577-005-0997-2
- Fitzgerald MS, McKnight TD, Shippen DE (1996) Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14422–14427
- Friml J, Benfey P, Benkova E et al (2006) Apical-basal polarity: why plant cells don't stand on their heads. *Trends Plant Sci* 11:12–14. doi:10.1016/j.tplants.2005.11.010
- Fulneckova J, Hasikova T, Fajkus J, Lukesova A, Elias M, Sykorova E (2012) Dynamic evolution of telomeric sequences in the green algal order Chlamydomonadales. *Genome Biol Evol* 4:248–264. doi:10.1093/gbe/evs007
- Fulneckova J, Sevcikova T, Fajkus J, Lukesova A, Lukes M, Vlcek C, Lang BF, King E, Elias M, Sykorova E (2013) A broad phylogenetic survey unveils the diversity and evolution of telomeres in eukaryotes. *Genome Biol Evol* 5:468–483. doi:10.1093/gbe/evt019
- Gallego ME, White CI (2001) RAD50 function is essential for telomere maintenance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1711–1716. doi:10.1073/pnas.98.4.1711
- Gallego ME, Bleuyard JY, Daoudal-Cotterell S, Jallut N, White CI (2003) Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in Arabidopsis. *Plant J* 35:557–565
- Graham LE, Cook ME, Busse JS (2000) The origin of plants: body plan changes contributing to a major evolutionary radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4535–4540. doi:10.1073/pnas.97.9.4535
- Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43:405–413. doi:10.1016/0092-8674(85)90170-9
- Greider CW, Blackburn EH (1987) The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with 2 kinds of primer specificity. *Cell* 51:887–898. doi:10.1016/0092-8674(87)90576-9
- Greider CW, Blackburn EH (1989) A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337:331–337. doi:10.1038/337331a0
- Harries PA, Pan AH, Quatran RS (2005) Actin-related protein2/3 complex component ARPC1 is required for proper cell morphogenesis and polarized cell growth in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 17:2327–2339. doi:10.1105/tpc.105.033266
- Heacock ML, Idol RA, Friesner JD, Britt AB, Shippen DE (2007) Telomere dynamics and fusion of critically shortened telomeres in plants lacking DNA ligase IV. *Nucleic Acids Res* 35:6490–6500. doi:10.1093/nar/gkm472
- Herbert BS, Hochreiter AE, Wright WE, Shay JW (2006) Nonradioactive detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol. *Nat Protoc* 1:1583–1590. doi:10.1038/nprot.2006.239
- Hola M, Kozak J, Vagnerova R, Angelis KJ (2013) Genotoxin induced mutagenesis in the model plant *Physcomitrella patens*. *Biomed Res Int* 2013:535049. doi:10.1155/2013/535049
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19:4780. doi:10.1093/nar/19.17.4780
- Jaske K, Mokros P, Mozgova I, Fojtova M, Fajkus J (2013) A telomerase-independent component of telomere loss in chromatin assembly factor 1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 122:285–293. doi:10.1007/s00412-013-0400-6

- Kamisugi Y, Schlink K, Rensing SA, Schween G, von Stackelberg M, Cuming AC, Reski R, Cove DJ (2006) The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic Acids Res* 34:6205–6214
- Kamisugi Y, Schaefer DG, Kozak J, Charlot F, Vrielynck N, Holá M, Angelis KJ, Cuming AC, Nogue F (2012) MRE11 and RAD50, but not NBS1, are essential for gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Res* 40:3496–3510. doi:10.1093/nar/gkr1272
- Kazda A, Zellinger B, Rossler M, Derboven E, Kusenda B, Riha K (2012) Chromosome end protection by blunt-ended telomeres. *Genes Dev* 26:1703–1713. doi:10.1101/gad.194944.112
- Knight CD, Cove DJ, Cuming AC, Quatrano RS (2002) Moss gene technology. In: Gilmartin PM, Bowler C (eds) *Molecular plant biology*, vol 2. Oxford University Press, Oxford, pp 285–299
- Kozak J, West CE, White C, da Costa-Nunes JA, Angelis KJ (2009) Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis thaliana* is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance. *DNA Repair (Amst)* 8:413–419. doi:10.1016/j.dnarep.2008.11.012
- Majerska J, Sykora E, Fajkus J (2011) Non-telomeric activities of telomerase. *Mol BioSyst* 7:1013–1023. doi:10.1039/C0mb00268b
- McClintock B (1941) The stability of broken rmds of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26:234–282
- Ming R, VanBuren R, Liu Y et al (2013) Genome of the long-living sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Genome Biol* 14:R41. doi:10.1186/Gb-2013-14-5-R41
- Najdekrova L, Siroky J (2012) NBS1 plays a synergistic role with telomerase in the maintenance of telomeres in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 12:167. doi:10.1186/1471-2229-12-167
- Olive PL, Banath JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1:23–29. doi:10.1038/nprot.2006.5
- Olovnikov AM (1971) Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201:1496–1499
- Pfaffl MW (2004) Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA (ed) *A-Z of quantitative PCR*. International University Line, La Jolla, pp 87–112
- Pich U, Fuchs J, Schubert I (1996) How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Res* 4:207–213. doi:10.1007/Bf02254961
- Prigge MJ, Bezanilla M (2010) Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development* 137:3535–3543. doi:10.1242/Dev.049023
- Rensing SA, Fritrowsky D, Lang D, Reski R (2005) Protein encoding genes in an ancient plant: analysis of codon usage, retained genes and splice sites in a moss, *Physcomitrella patens*. *BMC Genom* 6:43. doi:10.1186/1471-2164-6-43
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD et al (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319:64–69. doi:10.1126/science.1150646
- Riha K, Fajkus J, Siroky J, Vyskot B (1998) Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants. *Plant Cell* 10:1691–1698
- Riha K, Watson JM, Parkey J, Shippen DE (2002) Telomere length deregulation and enhanced sensitivity to genotoxic stress in *Arabidopsis* mutants deficient in Ku70. *EMBO J* 21:2819–2826. doi:10.1093/emboj/21.11.2819
- Rossignol P, Collier S, Bush M, Shaw P, Doonan JH (2007) Arabidopsis POT1A interacts with TERT-V(18), an N-terminal splicing variant of telomerase. *J Cell Sci* 120:3678–3687. doi:10.1242/jcs.004119
- Ruckova E, Friml J, Schrupfova PP, Fajkus J (2008) Role of alternative telomere lengthening unmasked in telomerase knock-out mutant plants. *Plant Mol Biol* 66:637–646. doi:10.1007/s11103-008-9295-7
- Schaefer DG (2002) A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Plant Biol* 53:477–501. doi:10.1146/annurev.arplant.53.100301.135202
- Shakirov EV, Perroud PF, Nelson AD, Cannell ME, Quatrano RS, Shippen DE (2010) Protection of Telomeres 1 is required for telomere integrity in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 22:1838–1848. doi:10.1105/tpc.110.075846
- Smidkova M, Holá M, Angelis KJ (2010) Efficient biolistic transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Biol Plant* 54:777–780
- Suzuki K (2004) Characterization of telomere DNA among five species of pteridophytes and bryophytes. *J Bryol* 26:175–180. doi:10.1179/037366804x5279
- Sykora E, Fajkus J (2009) Structure-function relationships in telomerase genes. *Biol Cell* 101:375–392. doi:10.1042/Bc20080205
- Sykora E, Lim KY, Chase MW, Knapp S, Leitch IJ, Leitch AR, Fajkus J (2003a) The absence of Arabidopsis-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae): first evidence from eudicots. *Plant J* 34:283–291
- Sykora E, Lim KY, Kunicka Z, Chase MW, Bennett MD, Fajkus J, Leitch AR (2003b) Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales. *Proc Biol Sci* 270:1893–1904. doi:10.1098/rspb.2003.2446
- Sykora E, Fajkus J, Meznikova M, Lim KY, Nepelchova K, Blattner FR, Chase MW, Leitch A (2006a) Minisatellite telomeres occur in the family Alliaceae but are lost in *Allium*. *Am J Bot* 93:814–823
- Sykora E, Rowland A, Leitch AR, Fajkus J (2006b) *Asparagales telomerases* which synthesize the human type of telomeres. *Plant Mol Biol* 60:633–646. doi:10.1007/s11103-005-5091-9
- Sykora E, Fulneckova J, Mokros P, Fajkus J, Fojtova M, Peska V (2012) Three TERT genes in *Nicotiana tabacum*. *Chromosome Res* 20:381–394. doi:10.1007/s10577-012-9282-3
- Viaene T, Landberg K, Thelander M, Medvecka E, Pederson E, Ferrar E, Cooper ED, Karimi M, Delwiche CF, Ljung K, Geisler M, Sundberg E, Friml J (2014) Directional auxin transport mechanisms in early diverging land plants. *Curr Biol* 24:2786–2791. doi:10.1016/j.cub.2014.09.056
- Worden AZ, Lee JH, Mock T et al (2009) Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*. *Science* 324:268–272. doi:10.1126/science.1167222
- Zachova D, Fojtova M, Dvorackova M, Mozgova I, Lermontova I, Peska V, Schubert I, Fajkus J, Sykora E (2013) Structure-function relationships during transgenic telomerase expression in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* 149:114–126. doi:10.1111/Ppl.12021
- Zimmer AD, Lang D, Buchta K, Rombauts S, Nishiyama T, Hasebe M, van de Peer Y, Rensing SA, Reski R (2013) Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions. *BMC Genom* 14:498. doi:10.1186/1471-2164-14-498