

**PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
KATEDRA GENETIKY**



**Analýza reparačne - deficitných mutantov
*Chlamydomonas reinhardtii***

Mgr. Andrea Ševčovičová

Dizertačná práca

Školiteľ: Prof. RNDr. Daniel Vlček, DrSc.

Bratislava 2001

Ďakujem svojmu školiteľovi Prof. RNDr. Danielovi Vlčkovi, DrSc. za odborné vedenie, cenné rady, pripomienky a za všestrannú pomoc, ktorú mi poskytol pri vypracovaní dizertačnej práce.

Ďalej by som chcela poďakovať prof. Dr. J.-D. Rochaixovi a Dr. A. Auchincloss, PhD. z Oddelenia molekulárnej biológie Univerzity v Ženeve za poskytnutie metodických rád, plazmidu a niektorých bakteriálnych a riasových kmeňov, ktoré sme použili v našich experimentoch. Ďakujem aj pracovníkom oddelenia molekulárnej genetiky ÚEO SAV za metodickú pomoc pri molekulárnej analýze reparačne deficitných mutantov.

Zároveň by som chcela poďakovať Ing. J. Bukovianovi a pracovníkom Slovenského metrologického ústavu v Bratislave za vytvorenie podmienok a pomoc pri ožarovaní riasových kmeňov. Moje poďakovanie patrí aj RNDr. E. Gálovej, PhD. za ochotu a pomoc pri spracovaní práce. Osobitne ďakujem môjmu manželovi D. Ševčovičovi za všestrannú podporu a pomoc pri spracovaní dizertačnej práce.

V neposlednom rade ďakujem všetkým pracovníkom Katedry genetiky PriF UK, za vytvorenie vhodných podmienok pri experimentálnej práci a všetkým, ktorí sa akoukoľvek formou pričínili o realizáciu predkladanej práce.

Obsah

Úvod	1
1. Odpoveď bunky na pôsobenie faktorov prostredia s genotoxickým účinkom ...	4
1.1 <i>Faktory prostredia s genotoxickým účinkom</i>	4
1.1.1 UV žiarenie a jeho účinok na bunku	4
1.1.2 Ionizačné žiarenie a jeho účinok na bunku	7
1.1.3 Toxický a mutagénny účinok alkylačných zlúčenín	9
1.2 <i>Mechanizmy opravy DNA poškodení</i>	11
1.2.1 Reparačné mechanizmy priamo odstraňujúce poškodenie DNA	13
1.2.1.1 Fotoreaktivácia	13
1.2.1.2 Oprava spórových fotoproduktov	14
1.2.1.3 Oprava alkylovaných báz a alkylfosfotriesterov	14
1.2.1.4 Ligácia zlomov	16
1.2.2 Reparačné systémy opravujúce poškodenia DNA vo viacerých krokoch	16
1.2.2.1 Excízia poškodeného úseku	16
1.2.2.1.1 Bázová excízna oprava	17
1.2.2.1.2 Nukleotidová excízna oprava	19
1.2.2.1.3 Oprava chybné spárovaných báz („mismatch korekcia“).....	23
1.2.2.2 Rekombinačná oprava	25
1.2.2.3 Syntéza DNA cez poškodenie - mutagénna oprava	28
1.3 <i>Reparačné mechanizmy Chlamydomonas reinhardtii</i>	31
1.4 <i>Zastavenie bunkového cyklu ako odpoveď na poškodenie DNA</i>	34
1.4.1 Úloha <i>RAD9</i> génu	35
1.4.2 Mutanty s predpokladanou poruchou zastavenia bunkového cyklu u <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	37
2. Transformácia jadrového genómu Chlamydomonas reinhardtii	39
2.1 <i>Selektívne markery</i>	40
2.1.1 Markery komplementujúce mutácie <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	41
2.1.2 Markery nesúce rezistenciu na antibiotiká	42
2.2 <i>Metódy na zavedenie DNA do jadrového genómu Chlamydomonas reinhardtii</i>	42
2.2.1 Bombardovanie	43
2.2.2 Elektroporácia	43
2.2.3 Transformácia pomocou sklenených guľčiek	43

3. Ciele dizertačnej práce	45
4. Materiál a metódy	47
4.1 Použité kmene	47
4.2 Kultivačné médiá	48
4.2.1 Médiá použité na kultiváciu rias	48
4.2.2 Médiá použité na kultiváciu kvasiniek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
4.2.3 Médiá použité na kultiváciu baktérií <i>Escherichia coli</i>	52
4.3 Použité mutagény	52
4.4 Rádioaktívne značené chemikálie	52
4.5 Plazmid použitý na transformáciu	53
4.6 Stanovenie prežívania a mutability reparačne-deficitných kmeňov <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> po pôsobení UV-žiarenia, MMS a X-žiarenia	53
4.6.1 Príprava buniek na ovplyvňovanie mutagénmi	53
4.6.2 Zastavenie bunkového cyklu <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> pomocou MBC	54
4.6.3 Ovplyvnenie buniek <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mutagénmi	54
4.6.4 Stanovenie prežívania	55
4.6.5 Stanovenie mutability	55
4.7 Stanovenie prežívania buniek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po pôsobení UV-žiarenia, MMS a X-žiarenia	56
4.7.1 Príprava buniek na ovplyvňovanie mutagénmi	56
4.7.2 Ovplyvnenie buniek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutagénmi	56
4.8 Genetická analýza <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	57
4.8.1 Rekombinačná analýza	57
4.8.2 Analýza na úrovni zygót	58
4.9 Stanovenie excízie pyrimidínových dimérov po pôsobení UV žiarenia	58
4.10 Fluorescenčná mikroskopia	64
4.11 Transformácia buniek <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	64
4.11.1 Izolácia plazmidovej DNA z <i>Escherichia coli</i>	64
4.11.2 Štiepenie plazmidovej DNA reštrikčnou endonukleázou NcoI	65
4.11.3 Elektroforéza DNA	65
4.11.4 Izolácia autolyzínu	65
4.11.5 Odstránenie bunkovej steny <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> pomocou autolyzínu	67
4.11.6 Transformácia buniek <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	67
5. Výsledky	68
5.1 Letálnohy a mutagénny účinok MNNG a X-žiarenia na reparačne deficitné kmene <i>Chlamydomonas renhardtii</i>	68
5.1.1 Prežívanie po pôsobení MNNG a X-žiarenia	68
5.1.2 Mutabilita po pôsobení MNNG a X-žiarenia	74
5.2 Vyštiepovania pyrimidínových dimérov pri reparačne-deficitných mutantov <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	75
5.3 Genetická analýza	79
5.4 Vplyv mikrotubulového jedu metyl benzimidazol 2-yl-karbamátu na zastavenie bunkového cyklu riasy <i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> využitím fluorescenčnej mikroskopie	81
5.5 Prežívanie mutantného kmeňa <i>rad9 Saccharomyces cerevisiae</i> po pôsobení UV-žiarenia, X- žiarenia a MMS a sledovanie vplyvu MBC na zmenu prežívania	82

5.6 Prežívanie mutantného kmeňa <i>uvs11 Chlamydomonas reinhardtii</i> po pôsobení UV-žiarenia, X-žiarenia a MMS a sledovanie vplyvu MBC na zmenu prežívania	84
5.7 Transformácia jadrového genómu <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	89
5.7.1 Izolácia plazmidu pARG7.8	89
5.7.2 Hodnotenie účinnosti transformácie	89
6. Diskusia	92
7. Závery	107
8. Literatúra	110

Zoznam použitých skratiek

AP miesto	abázické miesto v DNA
ATP	adenozín trifosfát
BER	bázová excízna reparácia
bp	bázový pár
cpm	počet impulzov za minútu
DAPI	4, 6 – diamidino – 2 - fenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSB	dvojreťazcové zlomy DNA
dsDNA	dvojvláknová DNA
EDTA	sodná soľ kyseliny etyléndiamíntetraoctovej
FADH ⁻	redukovaný flavínadenínukleotid
kb	kilobáza
kDa	kiloDalton
Mb	megabáza
MBC	metylbenzimidazol – 2 – yl karbamát, karbendazin
MMS	metylmetánsulfát
MNNG	N – metyl – N' – nitro – N - nitrózoguanidín
MNU	N – metyl – N – nitrózomočovina
mt+, mt-	označenie párovacích typov u riasy
NER	nuleotidová excízna reparácia
PCR	polymerázová reťazová reakcia
pDNA	plazmidová DNA
PEG	polyetylénglykol
PFGE	pulzná gelová elektroforéza
PM	Petriho miska
POPOP	1, 4 – di [2 – (fenyloxazolyl)] benzén
PPO	2, 5 difenyloxid
<i>rad</i>	označenie reparačne-deficitných mutantov <i>S. cerevisiae</i>
rad	jednotka radiácie
RT	izbová teplota
SDS	dodecylsírán sodný
SLT	toluénová scintlačná kvapalina
ssDNA	jednovláknová DNA
TCA	kyselina trichlóroctová
UV žiarenie	ultrafialové žiarenie
<i>uvr</i>	označenie UV rezistentných mutantov <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<i>uvs</i>	označenie UV citlivých mutantov <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
X žiarenie	ionizačné žiarenie

Úvod

DNA, v ktorej je zakódovaná genetická informácia, je veľmi dynamickou štruktúrou, podliehajúcou množstvu zmien vyvolaných pôsobením rôznych endogénnych alebo environmentálnych faktorov (produkty bunkového metabolizmu, chemické mutagény, kyslíkové radikály, UV a ionizačné žiarenie), ktoré majú za následok zmenu alebo nahradenie normálnych báz DNA. Vzniknuté poškodenie DNA má cytotoxický alebo mutagénny účinok, môže tiež spôsobiť zastavenie bunkového cyklu. Je preto pochopiteľné, že organizmy si v priebehu evolúcie vyvinuli mechanizmy, ktoré im umožňujú tolerovať alebo opraviť poškodenia DNA. Označujú sa pojmom opravné (reparačné) mechanizmy.

Už viac ako štyridsať rokov je pozornosť vedcov uprená na štúdium vzniku poškodení DNA a ich opravy, ktorých objasnenie by pomohlo pochopiť nielen vzťah mutagenézy a reparačných mechanizmov, ale tiež odhaliť príčiny chorôb spôsobených poruchou týchto systémov. Pokles aktivity reparačných enzýmov je jedným zo sprievodných znakov stárnutia, počas ktorého sa akumulujú poškodenia DNA. Poruchy reparačných procesov tiež hrajú významnú úlohu v procese karcinogenézy. V súčasnosti sa potreba štúdia reparačných mechanizmov stáva veľmi aktuálnou aj v súvislosti s poškodením ozónovej vrstvy a zvyšovaním koncentrácie chemických mutagénov a promutagénov v životnom prostredí. Na druhej strane, zaujímavá je aj úloha DNA poškodenia a jeho opravy pri tvorbe genetickej diverzity. Niektoré mechanizmy tolerancie DNA poškodenia, umožňujúce bunke deliť sa aj v prítomnosti poškodenia, sú zodpovedné za mutagénny vplyv rôznych DNA poškodzujúcich agensov. Zmenená genetická informácia môže byť v určitých prípadoch i výhodou a pri rýchlo sa meniacich

podmienkach prostredia poskytnúť jej nositeľom selekčnú výhodu a umožniť im prežitie. Pochopenie mechanizmu vzniku genetických zmien teda napomáha pri štúdiu evolúcie, takisto ako aj v génovom inžinierstve

Keďže reparačné mechanizmy boli zjavne potrebné od počiatku evolúcie živých organizmov, dá sa predpokladať, že molekulárna podstata reparačných systémov bude v evolúcii konzervovaná. Začiatky výskumu reparačných mechanizmov sú spojené s prokaryotickým organizmom, baktériou *Escherichia coli*. Genetické a biochemické prístupy a hlavne zavedenie metód rekombinantných DNA umožnili získať množstvo informácií o priebehu reparačných procesov u baktérií a o funkcii jednotlivých génov a ich produktov v jednotlivých reparačných dráhach. Vychádzajúc z týchto poznatkov sa podarilo dokázať existenciu podobných reparačných ciest aj u eukaryotických organizmov, vrátane človeka, hoci genetická a molekulárna analýza ešte nie sú na takom stupni ako pri baktériách. Súvisí to najmä so zložitou štruktúrou a organizáciou genómu eukaryotických buniek, ale aj s mnohobunkovou organizáciou a diferenciaciou buniek pri vyšších organizmoch.

K najpreštudovanejším eukaryotickým organizmom patria kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré majú heterotrofný typ výživy. Avšak podstatne menej poznatkov týkajúcich sa opravy DNA poškodení sa získalo pri fotoautotrofných organizmoch. Je potrebné zistiť, či všetky reparačné systémy definované pri heterotrofných organizmoch existujú aj pri fototrofných organizmoch. Problémy so štúdiom reparačných mechanizmov pri rastlinách súvisia najmä s náročnou izoláciou mutantov. A práve *C. reinhardtii*, ktorý svojimi vlastnosťami a štruktúrou bunky pripomína vyššie rastliny, poskytuje možnosti štúdia reparačných mechanizmov fotoautotrofných organizmov a umožňuje extrapolovať získané výsledky aj na vyššie rastliny. I keď sa so štúdiom v oblasti reparačných systémov a izoláciou reparačne-deficitných kmeňov pri riasach a kvasinkách začalo približne v rovnakom období, problematika opravy DNA poškodení je pri riasach doteraz menej detailne preskúmaná. Jednu z hlavných príčin možno hľadať v malej zbierke definovaných reparačne-deficitných mutantov, ktorá môže len s malou pravdepodobnosťou pokryť všetky reparačné cesty. Mutantné kmene s poruchou opravy DNA boli pri riasach *C. reinhardtii* izolované na základe zmenenej citlivosti k UV žiareniu oproti štandardnému kmeňu. Doteraz bolo izolovaných približne

26 reparačne-defektných mutantov, ktoré boli na základe ich citlivosti k UV označené ako *uvs* (UV-sensitive) (Davies, 1967). Prítomnosť troch genetických systémov pri fotoautotrofných organizmoch umožňuje sledovať opravu DNA v jadre, chloroplastoch a mitochondriách a ich vzájomné prepojenie. V súčasnosti sa najbohatšia zbierka mutantov *C. reinhardtii* s poruchou opravy DNA nachádza na Katedre genetiky PvF UK v Bratislave.

Predkladaná práca si kladie za cieľ prispieť k rozšíreniu poznatkov o jednotlivých reparačne-deficitných mutantoch jednobunkovej zelenej riasy *C. reinhardtii* ako základného predpokladu pre štúdium funkcie reparačných mechanizmov pri fotoautotrofných organizmoch.

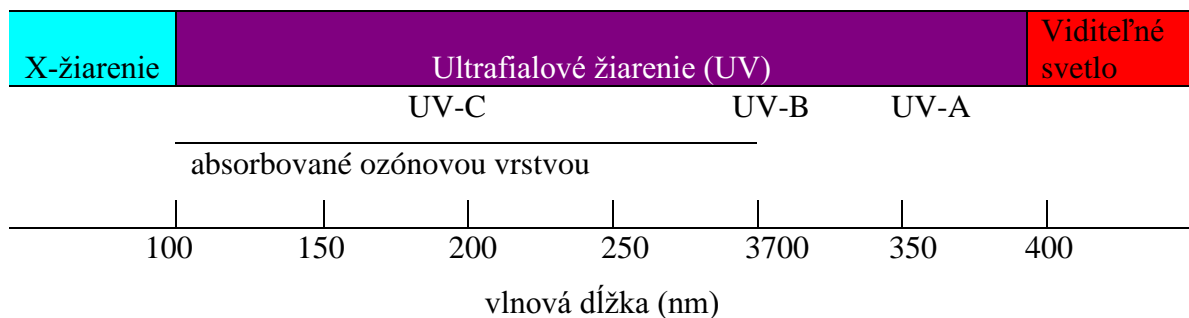
Kapitola 1

Odpoved' bunky na pôsobenie faktorov prostredia s genotoxickým účinkom

1.1 Faktory prostredia s genotoxickým účinkom

1.1.1 UV žiarenie a jeho účinok na bunku.

So štúdiom vplyvu UV žiarenia a jeho následkov na bunku a DNA sú späté začiatky štúdia opravy poškodení DNA. Vystavenie buniek účinku UV-žiarenia je pravdepodobne najlepšie preštudovaným a najčastejšie používaným modelovým systémom na štúdium biologických následkov poškodenia DNA, jeho opravy a tolerancie. Jedným z atribútov UV-žiarenia je aj to, že živé organizmy sa od počiatku evolúcie života na našej planéte museli a dodnes musia vysporiadať s genotoxickými účinkami slnečného UV-žiarenia.

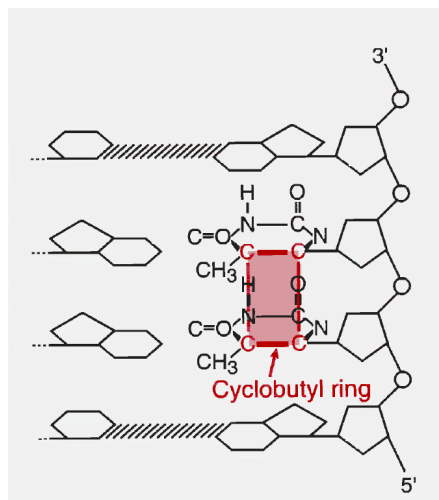


Obr. 1.1 Spektrum UV-žiarenia.

UV žiarenie je elektromagnetické vlnenie s vlnovou dĺžkou 9-400 nm s energiou kvanta 3 120 eV. Fotóny majú relatívne nízku energetickú hodnotu, preto nevyvolávajú ionizáciu atómov a molekúl, ale len ich excitáciu (t.j. presun elektrónov na orbitály s vyššou energetickou hladinou). Molekuly v bunke sa tak dostávajú do excitovaného stavu, zvyšuje sa ich reaktivita, čo vedie k fotochemickým reakciám a vzniku zmien.

Spektrum UV-žiarenia sa delí na 3 oblasti, označené ako UV-A s vlnovou dĺžkou 320 - 400 nm, UV-B s vlnovou dĺžkou 290 -320 nm a UV-C s vlnovou dĺžkou 10 - 290 nm (Obr. 1.1). UV radiácia vysielaná Slnkom na Zem pozostáva hlavne z UV-A a UV-B, pretože ozónová vrstva atmosféry zachytáva žiarenie s vlnovou dĺžkou pod 302 nm.

Biologicky najúčinnšie je UV žiarenie s vlnovou dĺžkou okolo 260 nm, ktoré je maximálne absorbované nukleovými kyselinami (s absorpčným maximom 254 nm) a proteínmi (s absorpčným maximom 280 nm) (Smith a Hanawalt, 1972).



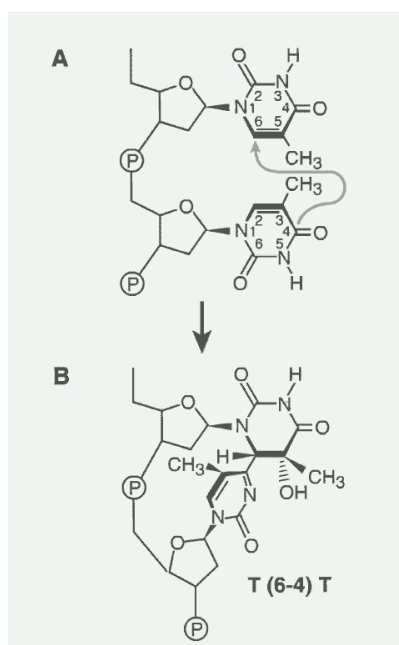
Obr. 1.2 Cyklobutánový pyrimidínový dimér. Susedné tymíny sú spojené kovalentnou väzbou cez C(5) a C(6). (Prevzaté z Friedberg et al , 1995)

Účinok UV žiarenia na DNA môže byť priamy alebo nepriamy. Nepriamy účinok spočíva vo vzniku radikálov, ktoré sú vysoko reaktívne a spôsobujú zmeny v biomakromolekulách. Priamy účinok spočíva v bezprostrednom pôsobení na DNA. V súčasnosti je opísané široké spektrum fotoproduktov vznikajúcich v DNA po pôsobení UV žiarenia. Samotná citlivosť DNA k pôsobeniu UV žiarenia závisí od viacerých faktorov: biologických (napr. štádium bunkového cyklu), chemických (napr. zámena

molekúl ich analógmi) a fyzikálnych (napr. teplota, denaturácia atď.) (Smith a Hanawalt, 1972).

Základným typom poškodenia sú pyrimidínové diméry (TT, TC, CC), z ktorých najčastejšie sú diméry tymínu (Obr. 1.3). Vznikajú spojením dvoch tymínov v tom istom reťazci, alebo zriedkavejšie v antiparalelných reťazcoch. Najskôr dochádza k rozštípeniu dvojitej väzby medzi 5. a 6. uhlíkom a následnému vzniku veľmi stabilného cyklobutánového kruhu medzi dvoma tymínmi (Sweder, 1994). Dimerizácia je sprevádzaná lokálnou denaturáciou a konformačnou zmenou v DNA. Tvorbu pyrimidínových dimérov pôsobením UV žiarenia dokázali Beukers a Berends (1960).

Medzi ďalšie typy poškodenia spôsobené UV žiarením patria pyrimidín-pyrimidón (6-4) fotoprodukty (6-4 adukty) (Obr. 1.3). Toto poškodenie je spôsobené väzbou susedných pyrimidínov cez C(6) a C(4) v smere 5' - 3'. 6 - 4 adukty navodzujú veľké konformačné zmeny v DNA, ktoré sú analogické vypadnutiam báz. 6-4 adukty sú oveľa zriedkavejšie ako pyrimidínové diméry, na jeden 6-4 adukt pripadá približne 4-5 dimérov (Sweder, 1994).



Obr. 1.3 6-4 adukt. Susedné pyrimidíny sú spojené väzbou cez C(6) a C(4) v smere 5' - 3'. (Prevzaté z Friedberg et al , 1995)

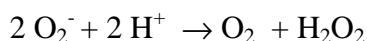
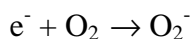
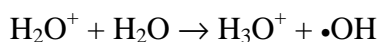
UV žiarenie ďalej spôsobuje jednoreťazcové zlomy, DNA - proteínové krížové väzby a hydráty báz, ktorých následkom môže byť chybné párovanie báz počas replikácie (Stapleton, 1992). Tieto poškodenia sú oveľa vážnejšie a do ich opravy sa okrem fotoreparácie a excíznej reparačnej dráhy zapájajú aj ostatné opravné mechanizmy (Friedberg et al., 1995).

Poškodenie spôsobené UV žiarením môže zasahovať obe základné funkcie genetického materiálu, ktorými sú ochrana dedičnej informácie vo fylogénéze a s ňou spojená replikácia DNA, ako aj realizácia genetického programu v ontogenéze a s tým spojená transkripcia a translácia. Výsledný efekt UV žiarenia môže mať mutagénny alebo letálny charakter. O ďalšej existencii bunky rozhodnú reparačné mechanizmy, ktoré sú schopné tieto poškodenia odstrániť alebo zabezpečiť ich tolerovanie pri ďalšej replikácii.

1.1.2 Ionizačné žiarenie a jeho účinok na bunku

Ionizačné žiarenie patrí medzi prirodzene sa vyskytujúce agensy spôsobujúce poškodenia DNA všetkých živých organizmov na Zemi od počiatku biologickej evolúcie. Ionizačné žiarenie môže náhodne poškodzovať všetky bunkové komponenty a indukovať široké spektrum DNA poškodení (Ward, 1988; Britt, 1996; Lenkinen, 1996; Haveles et al., 2000). Ionizačné žiarenie vyvoláva tvorbu excitovaných a ionizovaných molekúl. Účinok ionizačného žiarenia (podobne ako UV žiarenia) môže byť priamy alebo nepriamy (Ward, 1988; Ward, 1994). Priamy účinok spočíva v bezprostrednej interakcii radiačnej energie s DNA. Nepriamy účinok spočíva v interakcii DNA s reaktívnymi látkami vzniknutými vplyvom žiarenia. Tieto reaktívne látky vznikajú ako dôsledok interakcie látok obklopujúcich molekulu DNA s radiačným žiarením. Výsledkom takejto interakcie môže byť široké spektrum (potenciálnych zdrojov) reaktívnych látok akými sú excitované molekuly, iónové radikály alebo voľné radikály, ktoré sú následnou rozkladnou reakciou napokon premenené na chemicky stabilné látky. Táto rozmanitosť reakčných mechanizmov a ešte väčší počet potenciálnych reaktantov vytvára možnosti pre široké spektrum reaktívnych agensov vzniknutých pôsobením ionizačného žiarenia na DNA.

Prevaha vody v biologických systémoch naznačuje, že hlavným zdrojom nepriameho poškodenia DNA budú látky vzniknuté hydrolýzou vody (Ward,., 1988):



Väčšina poškodení DNA vzniká pôsobením hydroxylových radikálov (približne 65% vplyvom $\bullet\text{OH}$ radikálov ku približne 35% vplyvom priameho účinku ionizačného žiarenia) (Ward,., 1988).

Medzi hlavné typy poškodení DNA spôsobených ionizačným žiarením patria reťazcové zlomy, DNA-proteínové krížové väzby a rôzne poškodenia báz a deoxyribózy (Lewis et al., 1999).

Najviac poškodení spôsobených ionizačným žiarením bolo opísaných na tymíne. $\bullet\text{OH}$ radikály najčastejšie atakujú C-5=C-6 dvojtitú väzbu. Predpokladá sa, že priamy účinok ionizačného žiarenia môže viesť k vypudeniu elektrónu z nenasýtenej C-5 alebo C-6 pozície a výsledný kationový radikál môže reagovať s hydroxylovým iónom (Ward, 1988). Preto priamy a nepriamy účinok žiarenia môže mať za následok vznik identických reaktívnych intermediátov.

Ionizačné žiarenie často spôsobuje úseky lokálne nespárovaných reťazcov DNA, ktoré môžu byť detegované ako miesta citlivé k pôsobeniu endonukleáz (napr. S1 nukleáza) (Andrews et al., 1984).

Poškodenia deoxyribózy nie sú až také časté ako poškodenia báz, avšak tiež môžu spôsobovať reťazcové zlomy. Iniciačným krokom ku vzniku jednoreťazcových zlomov je tvorba radikálov na deoxyribóze a následná strata atómu vodíka. K tomuto môže dochádzať buď priamym vplyvom ionizačného žiarenia alebo nepriamo vplyvom $\bullet\text{OH}$ radikálov. Radikál môže následne reagovať s kyslíkom a vytvoriť peroxyradikál. Z uvedeného vyplýva, že prítomnosť alebo vyššia koncentrácia kyslíka môže spôsobovať

rozdiely v spektre a frekvencii poškodení spôsobených ionizačným žiarením. Tento fenomén sa označuje ako kyslíkový efekt (Ward, 1990; Boreham a Mitchel, 1993).

Ionizačné žiarenie vyvoláva vznik reťazcových zlomov aj priamo a práve týmto zlomom (najmä dvojreťazcovým) sa pripisuje najväčšia časť letálneho účinku ionizačného žiarenia (Ward, 1990; Lewis et al., 1999).

Energia ionizačného žiarenia spôsobuje široké spektrum DNA poškodení. Mnohé z nich majú letálny vplyv na bunku, iné spôsobujú mutácie alebo malígnu transformáciu bunky. Závažnosť jednotlivých poškodení z hľadiska prežívania, mutagenézy a malígnej transformácie je ťažko stanoviť a v jednotlivých systémoch sa môže meniť. O schopnosti bunky vysporiadať sa s takýmito poškodeniami rozhoduje prítomnosť reparačných mechanizmov.

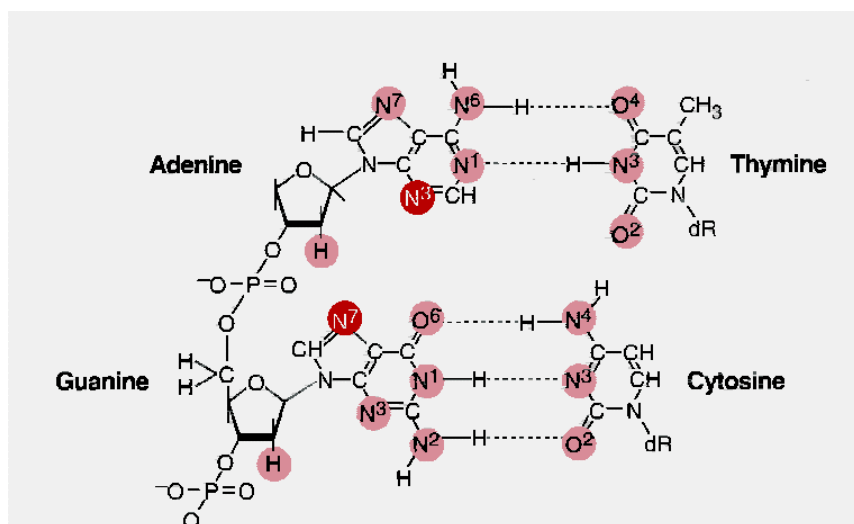
1.1.3 Toxický a mutagénny účinok alkylačných zlúčenín

Alkylačné látky patria k elektrofilným zlúčeninám s afinitou k nukleofilným centráam organických makromolekúl. Do tejto skupiny patrí široké spektrum chemických látok, medzi ktorými sú aj intermediáty bunkového metabolizmu (napr. S-adenozyl-metionín), ktoré tiež môžu alkylovať DNA (Rebeck a Samson, 1991; Lindahl, 1993). Z hľadiska mutagénneho a karcinogénneho procesu sú obzvlášť dôležité reakcie alkylačných látok s nukleofilnými centrami v molekule DNA (Obr. 1.4), na ktoré prenášajú alkylové skupiny.

Z funkčného hľadiska delíme alkylačné látky na monofunkčné, pri ktorých jedna reaktívna skupina uvoľnená z jednej molekuly alkylačnej látky reaguje s jedným nukleofilným centrom a na polyfunkčné, kde jedna reaktívna skupina môže reagovať súčasne s viacerými nukleofilnými centrami (Velemínský a Gichner, 1982).

Alkylačné látky reagujú častejšie so silnejšími nukleofilnými centrami na dusíkoch a o niečo zriedkavejšie s nukleofilnými centrami kyslíkov. Najreaktívnejšími pozíciami sú N7 guanínu a N3 adenínu. Okrem nich dochádza k reakciám na adeníne v polohe N1, N6 a N7, na guaníne N1, N2, N3 a O6, na cytozíne v N3, N4 a O2 a na tymíne v N3, O2 a O4 (Obr. 1.4) (Singer a Kušmírek, 1982).

N^3 metylpuríny a O^2 metylpyrimidíny inhibujú replikáciu DNA a ak by nedošlo k odstráneniu týchto poškodení, stávajú sa pre bunku letálne (Karran et al., 1982; Lindahl et al., 1988). O^6 metylguanín a O^4 metyltymín neinhibujú replikáciu DNA, ale patria medzi najhlavnejšie a najčastejšie mutagénne poškodenia spôsobené alkylačnými látkami (Lindahl, 1988). Ak nedôjde k ich oprave, pri replikácii môže dôjsť k nesprávnemu párovaniu a vzniku tranzičných mutácii $G:C \rightarrow A:T$ a $T:A \rightarrow C:G$ (Schendel a Michaeli, 1984; Ito et al., 1994). Modifikácia báz alkylačnými činidlami zoslabuje N-glykozidickú väzbu, môže dôjsť k depurinácii alebo depyrimidinizácii a vzniku tzv. abázických labilných miest (Loeb a Preston, 1986). Okrem báz môžu byť alkylované aj fosfátové skupiny za vzniku fosfotriestrov, ktoré vedú k zlomu reťazcov (Singer, 1986).



Obr. 1.4 Nukleofilné centrá na molekule DNA schopné tvorby kovalentnej väzby s alkylou skupinou, z nich N^7 guanín a N^3 adenín sú najčastejšie. (Prevzaté z Friedberg et al., 1995)

V dôsledku svojej schopnosti reagovať s viacerými nukleofilnými centrami v DNA súčasne, môžu polyfunkčné alkylačné látky tvoriť vnútroreťazcové a medzireťazcové DNA krížové väzby alebo DNA-proteínové krížové väzby. Najmä medzireťazcové krížové väzby sú veľmi závažným poškodením DNA, nakoľko zabráňujú rozdeleniu dvojvlákna, čím blokujú replikáciu DNA a transkripciu (Veľemínsky a Gichner, 1982).

1.2 Mechanizmy opravy DNA poškodení

Pojem oprava DNA zodpovedá bunkovým procesom spojeným s odstránením poškodených, modifikovaných alebo chybné spárovaných báz z genómu živej bunky. Táto definícia vymedzuje

1. priamu opravu DNA (t.j. monomerizáciu pyrimidínových dimérov pomocou enzýmu fotolyáza alebo dealkyláciu alkylovaných báz špecifickými alkyltransferázami)
2. báзовú excíznu opravu, pri ktorej sú poškodené alebo nevhodne zaradené bázy vyštiepené pomocou enzýmov označených ako DNA glykozylázy a AP endonukleázy
3. nukleotidovú excíznu opravu, pri ktorej je oligonukleotid obsahujúci poškodenie vyštiepený z DNA
4. oprava chybné spárovaných báz (tzv. mismatch korekcia), pri ktorej sú vyštiepené chybné spárované bázy vzniknuté počas semikonzervatívnej syntézy DNA (Friedberg et al., 1995).

<i>Odpoveď</i>	<i>Mechanizmus</i>
Priama oprava DNA poškodenia	Enzymatická fotoreaktivácia Reparácia spórových fotoproduktov Reparácia alkylovaných báz a alkylfosfortriesterov pomocou alkyltransferázy
Excízia DNA poškodenia	Ligácia zlomov reťazcov DNA Bázová excízna oprava Nukleotidová excízna oprava Mismatch oprava
Tolerovanie poškodenia DNA	Obídanie poškodeného úseku DNA s vytvorením medzery a rekombinácia Translézna syntéza DNA

Tab.1.1 Odpoveď bunky na poškodenie DNA.

Dodnes sa však v literatúre termínom oprava DNA označujú aj ďalšie odpovede bunky na poškodenie DNA, ktoré umožňujú bunke zvýšiť odolnosť k potenciálnym letálnym vplyvom poškodenia genómu, ale pri ktorých nedochádza k odstráneniu tohto poškodenia

z genómu bunky. Tieto tzv. mechanizmy tolerujúce DNA poškodenie zahŕňajú množstvo rekombinačných a mutagénnych procesov (viď Tab. 1.1) (Friedberg et al., 1995).

Bunky a organizmy defektné v oprave DNA poškodenia zvyčajne vykazujú zvýšenú citlivosť voči niektorým mutagénnym agensom. Tento typický fenotyp sa ukázal byť veľmi užitočný pri izolácii a genetickej charakteristike mutantov, ktorí sú základným predpokladom ku štúdiu reparačných mechanizmov. Doteraz bolo izolovaných mnoho mutantov ako pri prokaryotických, tak i pri eukaryotických organizmoch. Spomedzi eukaryotických organizmov sa najkompletnejšia zbierka reparačne-deficitných mutantov získala pri kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinkové mutanty so zvýšenou citlivosťou k UV- alebo ionizačnému žiareniu sa označujú ako *rad* mutanty (radiation-sensitive). Tieto mutanty boli rozdelené do troch epistatických skupín (Friedberg et al., 1988). Zatriedenie do určitej epistatickej skupiny sa určuje na základe fenotypovej podobnosti s už zatriedenými kmeňmi alebo porovnávaním prežívania dvojitého mutantov s prežívaním rodičovských kmeňov. Vychádza sa z hypotézy, že ak zmutujú dva gény patriace do tej istej reparačnej dráhy (t.j. do tej istej epistatickej skupiny), nemalo by sa líšiť prežívanie dvojitého mutantu od prežívania citlivejšieho rodiča. Ak dva zmutované gény patria do rôznych epistatických skupín, prežívanie dvojitého mutantu je nižšie ako prežívanie citlivejšieho rodiča. Na základe tejto analýzy sa podarilo *rad* mutantov rozdeliť do troch epistatických skupín pomenovaných po najlepšie charakterizovaných mutantoch *RAD3*, *RAD52* a *RAD6*. Fenotypová charakteristika týchto kmeňov naznačila, že *RAD3* epistatická skupina zahŕňa gény zúčastňujúce sa excíznej opravy, *RAD52* epistatická skupina zahŕňa gény rekombinačnej dráhy a *RAD6* mutagénnej dráhy (Friedberg et al., 1988).

Analogicky s kvasinkami *S. cerevisiae*, aj pri *C. reinhardtii* boli izolované reparačne deficitné mutanty, označené ako *uvs* mutanty (UV-sensitive), zatriedené do rôznych reparačných dráh na základe fenotypových charakteristík mutantných kmeňov a genetickej analýzy (Podstavková et al., 1991). Princíp genetickej analýzy je podobný ako pri kvasinkách, t.j. vychádza sa z prežívania dvojitého mutantov. Pri riasach sa doteraz podarilo izolovať mutantné kmene s poruchou v excíznej oprave a kmene s poruchou rekombinačného mechanizmu. Ďalšiu skupinu tvoria mutanty s doteraz nedefinovanou poruchou reparačnej dráhy (Davies, 1967; Rosen a Ebersold, 1972; Small

a Greimann, 1977a,b; Portney a Rosen, 1980; Vlčková a Vlček, 1984; Small, 1987; Vlček et al., 1987; Vlček et al., 1991; Podstavková et al., 1991; Podstavková et al., 1992; Podstavková et al., 1994; Miadoková et al., 1994; Vlček et al., 1995; Vlček et al., 1997; Slivková et al., 1998).

Snahy viacerých autorov o izoláciu ďalších kmeňov, citlivých na rôzne mutagény, ako aj o molekulárnu analýzu týchto kmeňov, dávajú predpoklady, že i pri riasach sa v krátkom čase doplnia medzery v našich poznatkoch o činnosti ich reparačných systémov.

1.2.1 Reparačné mechanizmy priamo odstraňujúce poškodenie DNA

Reparačné systémy patriace do tejto skupiny opravujú len určitý typ poškodenia a jeho reverziou *in situ* obnovujú pôvodný stav reťazcov DNA.

1.2.1.1 Fotoreaktivácia

Fotoreaktivácia je jedнокrokovým opravným procesom, pri ktorom katalyzuje enzým fotolyáza na svetle závislú opravu pyrimidínových dimérov (Sancar, 1992; Kim et al., 1993; Sancar, 1994). DNA fotolyáza je v prírode rozšírený enzým nájdený pri mikroorganizmoch, rastlinných aj živočíšnych bunkách (Yasui et al., 1994; O'Connor et al., 1996; Todo et al., 1996; Todo et al., 1997; Eisen a Hanawalt, 1999; Todo et al., 1999; Deisenhofer, 2000).

Fotolyázy mikroorganizmov a viacerých druhov živočíchov odstraňujú len jeden typ poškodenia indukovaného UV žiarením – pyrimidínové diméry cyklobutánového typu. Fotolyázy hmyzu a vyšších rastlín sú menej špecifické a katalyzujú aj opravu (6-4) fotoproduktov (Todo et al., 1993; Kim et al., 1994; Chen et al., 1994).

Tento systém je evolučne zakonzervovaný od baktérií až po cicavcov a predpokladá sa aj jeho úloha pri opravách v tme (Yamamoto et al., 1983). Zistilo sa, že DNA fotolyáza zvyšuje účinnosť nukleotidovej excíznej reparácie pri *E. coli*, aj pri kvasinkách (Sancar et al., 1984a; Myles et al., 1987; Sancar a Smith, 1989). Toto viedlo ku konštatovaniu, že DNA fotolyáza by mohla byť súčasťou excíznej reparačnej dráhy

(Myles et al., 1987; Sancar a Smith, 1989). Predpokladá sa, že DNA fotolyáza po naviazaní na miesto poškodenia spôsobuje konformačné zmeny DNA a umožňuje tak enzýmovému komplexu excíznej reparačnej dráhy, ktorý naštiepuje DNA v určitej vzdialenosti od poškodenia, ľahšie rozpoznať takéto poškodenie (Sancar a Smith, 1989). Na druhej strane, efektívnosť fotoreaktivácie je pri eukaryotoch ovplyvnená štruktúrou chromatinu. Zistilo sa, že pri *S. cerevisiae*, na rozdiel od nukleotidovej opravy, fotolyáza rýchlejšie opravuje pyrimidínové diméry v úsekoch mimo nukleozómov, v ktorých sa nachádzajú napr. aj promótory aktívnych génov (Suter et al., 1997).

1.2.1.2 Oprava spórových fotoproduktov

Tento typ opravy je špecifickým pre spóry *B. subtilis*, ktorých DNA je priestorovo usporiadaná do konformačného stavu A. Po pôsobení UV-žiarenia v takejto DNA vznikajú, namiesto pyrimidínových dimérov cyklobutánového typu, 5-tyminyl-5-6-dihydrotyminy, ktoré sa označujú ako spórové fotoprodukty (Setlow, 1992). Tieto poškodenia sú opravované lyázou, ktorá štiepi C-C väzbu medzi dvoma tymínmi. K aktivácii vyžaduje energiu, ale nie svetlo (Fajardo-Cavazos et al., 1993). Detailný mechanizmus opravy ešte nie je známy.

1.2.1.3 Oprava alkylovaných báz a alkylfosfotriesterov

Tento systém opravuje poškodenia DNA vzniknuté po pôsobení chemických agensov, ktoré alkylujú DNA (napr. MNNG, MMS, MNU) a dávajú vznik O-alkylovaným alebo N-alkylovaným produktom. Spomedzi nich sú O⁶alkylguanín a O⁴alkyltymín pre bunku najnebezpečnejšie, pretože spôsobujú chybné párovanie báz počas replikácie DNA. Zistilo sa, že mutagénny potenciál týchto alkylovaných báz spočíva v tendencii DNA polymerázy čítať O⁶alkylguanín ako adenín a O⁴alkyltymín ako cytozín, potom sa teda O⁶alkylguanín chybne páruje s tymínom a O⁴alkyltymín s guanínom (Friedberg et al., 1995).

V súvislosti s opravou alkylačných poškodení bol pri *E. coli* objavený a preštudovaný inducibilný proces označovaný ako adaptívna odpoveď. K jeho indukcii dochádza účinkom nízkej, nemutagénnej dávky alkylačnej látky. Ak po nej nasleduje vyššia, mutagénna dávka tej istej, alebo inej alkylačnej látky, je jej mutagénny a letálny účinok nižší v porovnaní s touto vysokou dávkou samotnou (Jeggo et al., 1977; Samson a Cairns, 1977). Z toho vyplýva, že vystavenie buniek *E. coli* subletálnym dávkam alkylačného agensu vedie k zvýšenej rezistencii k mutagénnemu a letálnemu účinku následných dávok alkylačnej látky (Samson a Cairns, 1977).

Pri *E. coli* bol izolovaný proteín s metyltransferázovou aktivitou (O^6 metylguanín DNA metyltransferáza - O^6 MGT I, Ada proteín), ktorý prenáša alkyl skupinu na SH-skupinu dvoch vlastných cysteínových zvyškov tvoriac tak S-metylcystein na proteíne. Cysteín v polohe 321 (na C-terminálnom konci) je akceptorom alkylových skupín z O-alkylovaných báz na DNA. Druhým alkylovaným cysteínom je cysteín v polohe 69, ktorý je akceptorom alkylových skupín pri alkylfosfotriesteroch. Naviazaním alkyl skupiny na molekulu O^6 MGT I dochádza k inaktivácii enzýmu a preto sa tento enzým označuje aj ako sebevražedný enzým („suicide enzyme“)(Yarosh, 1985; Lindahl et al., 1988; Daniels a Tainer, 2000). Alkylácia cysteínového zvyšku alkyltransferázy v polohe 69 spôsobuje konformačnú zmenu proteínu, ktorý sa mení na silný transkripčný aktivátor viažúci sa na promótor génov Ada operónu. Výsledkom je zvýšená transkripcia a translácia (Shevell et al., 1990).

Bunky *E. coli* obsahujú aj ďalší enzým s metyltransferázovou aktivitou, označený ako O^6 MGT II (19 kDa) a kódovaný génom *ogt*. Tento enzým sa od O^6 MGT I enzýmu líši tým, že nie je inducibilný nízkymi dávkami alkylačného agensu, má nižšiu molekulovú hmotnosť a neodstraňuje metyl skupiny z metylfosfotriesterov (Rebeck et al., 1988).

Alkyltransferázy boli nájdené pri všetkých doteraz testovaných heterotrofných organizmoch a vykazujú vysoký stupeň evolučnej konzervovanosti (Pegg et al., 1995, Memisoglu a Samson, 1996).

U človeka bol izolovaný 21,7 kDa proteín s O^6 MGT aktivitou, ktorý vykazuje veľmi nízku sekvenčnú homológiu s bakteriálnymi enzýmami a neodstraňuje alkylfosfotriestery (Dusenbery a Smith, 1996).

Pri kvasinkách sa gény s analogickou úlohou ako alkyltransferázový systém pri *E.coli* zistili až v posledných rokoch, čo súvisí s malým počtom molekúl tohto enzýmu v bunke a preto náročnou detekciou v bunkových extraktoch. Alkyltransferázový systém pri kvasinkách sa podarilo potvrdiť až po izolácii génu označeného *MGTI*, ktorý kóduje O⁶alkylguanínDNAalkyltransferázu (Sassanfar a Samson, 1990).

Pri rastlinách ešte nebola dokázaná prítomnosť O⁶MGT (Britt, 1996).

1.2.1.4 Ligácia zlomov

Ligáciu jedno a dvojreťazcových zlomov, ktoré vznikajú hydrolýzou fosfodiesterových väzieb dvojreťazcovej DNA po pôsobení rôznych agensov (napr. ionizačné žiarenie) a majú letálny účinok, zabezpečujú enzýmy DNA ligázy. Keďže všetky DNA ligázy vyžadujú voľné konce na molekule DNA bez chýbajúcich nukleotidov v mieste zlomu a prítomnosť priľahlých 3' OH a 5' P koncov, týmto spôsobom môžu byť opravené iba reťazcové zlomy vyznačujúce sa týmito vlastnosťami (Kornberg a Baker, 1992; Timson et al., 2000). Ostatné zlomy reťazcov DNA sú opravované zložitejšími mechanizmami opísanými neskôr.

1.2.2 Reparačné systémy opravujúce poškodenia DNA vo viacerých krokoch

Do tejto skupiny patria komplexnejšie mechanizmy opravy DNA, ktoré odstraňujú poškodenie jeho vyštípením z molekuly DNA (excíziou) alebo umožňujú bunke tolerovať poruchu štruktúry DNA rekombináciou alebo syntézou DNA cez poškodenie (Wood, 1996).

1.2.2.1 Excízia poškodeného úseku

Excízia poškodeného úseku patrí medzi najrozšírenejší a doposiaľ najlepšie preštudovaný mechanizmus opravy DNA poškodení. Je schopná reparovať najširšie spektrum

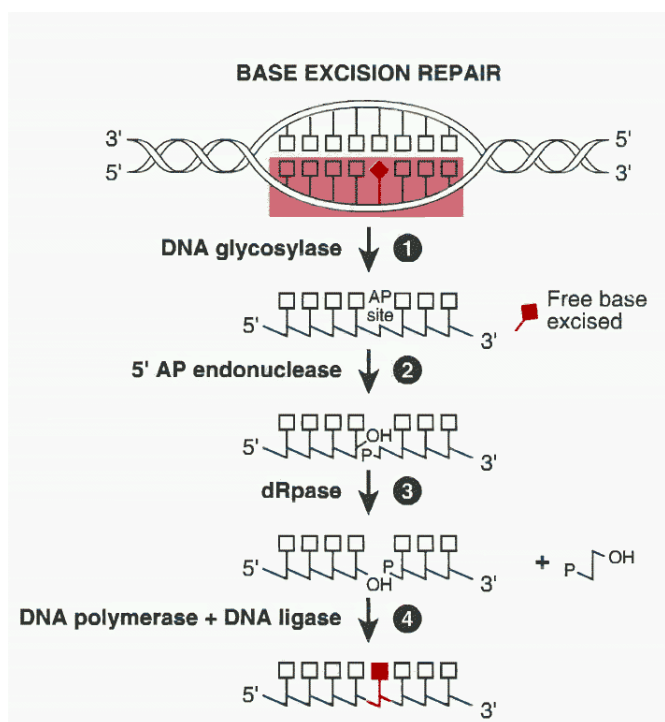
poškodení, ktoré boli vyvolané UV žiarením a niektorými chemickými agensami. Je známych niekoľko enzymatických mechanizmov, pomocou ktorých dochádza k vyštípeniu poškodených báz v bunkách. Ide buď o opravu monoadduktov (bázová excízna oprava - BER), o opravu rozsiahlejších poškodení (nukleotidová excízna oprava - NER), alebo o opravu chybné spárovaných báz vzniknutých počas replikácie DNA („mismatch“ oprava).

1.2.2.1.1 Bázová excízna oprava

Bázová excízna oprava predstavuje mechanizmus, ktorým bunky odstraňujú modifikované bázy, apurínové a apyrimidínové miesta a jednoreťazcové zlomy (Obr. 1.5) (Seeberg et al., 1995). Tieto typy poškodení vznikajú v bunke prirodzene dôsledkom metabolizmu alebo vplyvom vonkajších faktorov ako napr. alkylačnými a oxidačnými látkami, ionizujúcim žiarením alebo ultrafialovým žiarením typu A a B (Friedberg et al., 1995). V rámci bázovej excíznej opravy (BER) dochádza k excízii, čiže vyštípeniu poškodenej bázy, ktorá nemusí meniť štruktúru DNA, ale môže spôsobovať chybné párovanie počas replikácie a viesť tak k vzniku mutácie (Dusenbery a Smith, 1996).

BER je iniciovaná buď spontánnou stratou bázy alebo rôznymi modifikovanými bázami, ktoré sú rozpoznávané a štiepené špecifickými DNA glykozylázami. DNA glykozylázy katalyzujú hydrolýzu N-glykozidických väzieb viažúcich niektoré typy chemicky zmenených báz na deoxyribózo-fosfátovú kostru DNA. Výsledkom pôsobenia DNA glykozylázy je vznik apurínového alebo apyrimidínového miesta (AP miesto). Odstránenie AP miesta zabezpečujú enzýmy AP endonukleázy alebo AP lyázy, ktoré špecificky rozpoznávajú AP miesta a vytvárajú zárezy (incízie) v DNA hydrolýzou fosfodiesterovej väzby na strane k AP miestu (Sakumi a Sekiguchi, 1990). Takto vznikajú terminálne deoxyribózofosfátové zvyšky, ktoré sú potom odstránené nukleázami označenými exonukleázami. Na rozdiel od DNA glykozyláz a AP endonukleáz, exonukleázy nie sú enzýmami špecifickými pre opravu DNA, ale degradujú DNA na voľných koncoch (tie, ktoré sa zúčastňujú pri excíznej oprave, sa označujú aj ako DNA deoxyribosofosfodiesterázy) (Wood, 1996). Výsledkom je teda jednonukleotidová medzera

na DNA, ktorá je potom zaplnená pomocou DNA polymerázy β alebo DNA polymerázy δ a DNA ligáza spojí nový nukleotid s pôvodným reťazcom (Britt, 1996; Seeberg et al., 1996; Lloyd, 1998).



Obr. 1.5 Schéma bázevej excíznej opravy. (Prevzaté z Friedberg et al., 1995)

Väčšina DNA glykozyláz patrí medzi vysoko špecifické enzýmy odstraňujúce určitý typ poškodenia, pre niektoré je však charakteristická pomerne široká substrátová špecifita. Doteraz známe DNA glykozylázy možno na základe genetických a biochemických štúdií rozdeliť do dvoch tried. Do prvej triedy patria monofunkčné DNA glykozylázy ako napr. uracil DNA glykozyláza (UNG), ktoré štiepia N-glykozidickú väzbu za vzniku AP miesta (Krokan et al., 1997; Parikh et al., 2000; Pearl, 2000). Následne je AP miesto rozpoznané AP endonukleázou (APE), ktorá štiepi DNA fosfodiesterovú väzbu na 5' strane za vzniku 3' -OH a 5' -konca s fosforibózovým zvyškom (Doetsch a Cunningham, 1990; Mol et al., 2000; Piersen et al., 2000). Druhú triedu tvoria bifunkčné enzýmy, ktoré majú popri glykozylázovej aj lyázovú aktivitu ako napr. 8-oxoguanín DNA glykozyláza/AP lyáza (OGG) a ktoré po odstránení bázy štiepia fosfodiesterovú väzbu na 3' strane AP miesta

(Cunningham, 1997). Výsledkom takejto incízie je prirodzený 5' -koniec s fosfátovým zvyškom a 3' -koniec, ktorý vyžaduje úpravu AP endonukleázou II/3' - diesterázou. 3' OH-koniec slúži ako primer pre reparačnú syntézu katalyzovanú DNA polymerázou β (Bennet et al., 1997; Beard a Wilson, 2000).

AP miesta však môžu byť opravené i alternatívnou cestou, tzv. "long-patch" BER, pri ktorej ide o excíziu približne 2-6 nukleotidov (Matsumoto et al., 1994; Parikh et al., 1999). DNA polymeráza δ alebo ϵ v kooperácii s ďalšími komponentami (PCNA a RFC – replikačný faktor C) odstránia počas reparačnej syntézy poškodený úsek za vzniku 5' vyčnievajúceho ssDNA vlákna (Stucki et al., 1998). Táto špecifická štruktúra je rozpoznaná FEN-1 endonukleázou ("flap endonuclease 1"), ktorá interaguje s PCNA a DNA ligáza I na záver znovu zabezpečí spojenie novosyntetizovaného úseku k pôvodnej DNA.

DNA glykozylázy boli nájdené aj pri kvasinkách *S. cerevisiae*. Gén *NTG1* kóduje proteín homologický endonukleáze III *E. coli*, gén *MAG1* kóduje DNA glykozylázu odstraňujúcu metylované bázy z DNA a glykozylázoú/lyázovú aktivitu majú aj produkty ďalších génov (*OGG1*, *OGG2*) (Glassner et al., 1998). DNA glykozylázy boli nájdené aj pri mnohých iných organizmoch, vrátane človeka (Cunningham, 1998).

1.2.2.1.2 Nukleotidová excízna oprava

V rámci nukleotidovej excíznej opravy rozpoznáva reparačný komplex najširšie spektrum DNA poškodení (Britt, 1996; Wood, 1996). Na základe genetickej komplexnosti nukleotidovej excíznej opravy pri baktérii *E. coli*, kvasiniek a cicavcov sa predpokladá, že nukleotidová excízna reparácia (NER) je vysoko konzervovaná v evolúcii a je uskutočňovaná prostredníctvom multiproteínového komplexu, tzv. reparozómu, ktorý je zostavený v presne stanovenom poradí na miestach konformačných zmien spôsobených poškodeniami DNA (Obr. 1.6) (Friedberg, 1991; Prakash a Prakash, 2000).

NER je detailne preštudovaná najmä na bakteriálnom modeli *E. coli*. Veľké množstvo mutantov a vypracovanie *in vitro* reakcie umožnilo vniknúť do podstaty tohto

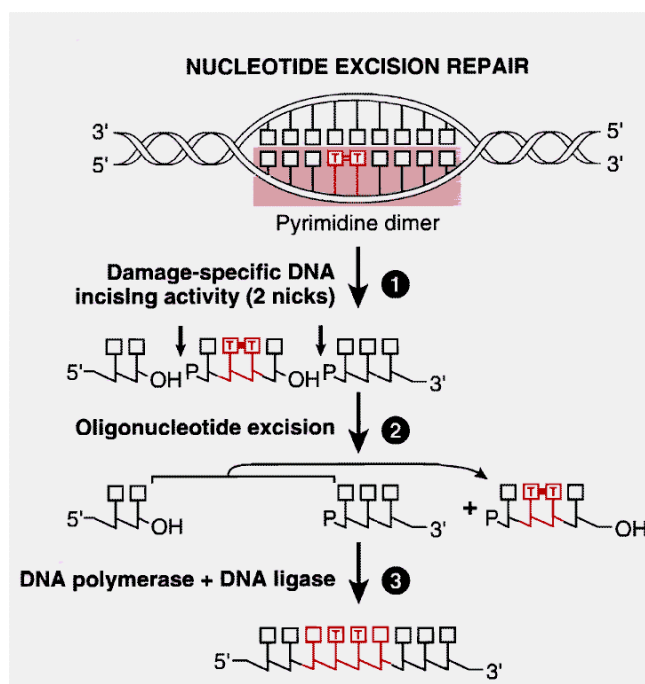
mechanizmu. V princípe sa uskutočňuje v nasledujúcich 5 krokoch, ktoré boli neskôr potvrdené aj pri eukaryotoch (Hoeijmakers, 1993; Moolenaar et al., 1997):

1. Rozpoznanie poškodenia - pri *E. coli* sú za tento krok zodpovedné produkty génov *uvrA*⁺ a *uvrB*⁺, ktoré vytvárajú komplex (UvrA)₂(UvrB)₁. Tento komplex sa nešpecificky viaže na DNA a vďaka svojej helikázovej aktivite s využitím energie získanej hydrolýzou ATP sa pohybuje po DNA. Ak sa dostane na miesto, kde je poškodená DNA, (UvrA)₂ sa uvoľní a vytvorí sa stabilný komplex (UvrB)₁-DNA a DNA je konformačne pripravená na incíziu. Tento proces vyžaduje hydrolýzu ATP, ktorá slúži na lokálne rozpletenie DNA v poškodenom mieste (Theis et al., 2000).
2. Dvojité naštiepenie – incízia. Rozštiepenie reťazca po oboch stranách v blízkosti poškodenia sa uskutoční po naviazaní UvrC proteínu na komplex (Uvr)₁-DNA. K naštiepeniu dôjde vo vzdialenosti 7 nukleotidov od poškodenia na 5' konci a 5 alebo 4 nukleotidy na 3' konci. Tento proces vyžaduje prítomnosť ATP.
3. Vyštiepenie – excízia. Nasleduje samotná excízia - odstránenie oligonukleotidu obsahujúceho poškodenie, za ktoré je zodpovedný produkt génu *uvrD*⁺ (DNA helikáza II). Spolu s uvoľnením oligonukleotidu obsahujúceho DNA poškodenie, dochádza aj k uvoľneniu UvrC proteínu.
4. Reparačná syntéza novej DNA, pri ktorej sa ako templát využíva nepoškodený reťazec a ktorú katalyzuje DNA polymeráza I (Pol I).
5. Ligácia katalyzovaná DNA ligázou zakončuje proces NER.

Hoci je uvedená postupnosť krokov evolučne zakonzervovaná od baktérií až po človeka, neexistuje štruktúrna homológia medzi proteínovými podjednotkami, ktoré sú zahrnuté v NER medzi prokaryontmi a eukaryontmi. Biochemické mechanizmy sú rozdielne (Petit a Sancar, 1999).

Rozpoznávame dve vzájomne sa prekrývajúce dráhy NER. Jedna – globálna genómová oprava (GGR – „global genome repair“) – je schopná eliminovať poškodenia zo všetkých častí genómu (Hanawalt a Mellon, 1993, Hanawalt, 2001). Niektoré typy poškodení opravuje GGR veľmi rýchlo a účinne (napr. UV-indukované 6-4 fotoprodukty), kým iné (napr. UV-indukované cyklobutánové pyrimidínové diméry – CPD) pomaly a menej účinne (Mitchel, 1988). Predpokladá sa, že pomaly opravované poškodenia určitú dobu bránia transkripcii, a preto sa vyvinul dodatočný opravný

mechanizmus, tzv. transkripčne viazaná oprava (TCR – „transcription-coupled repair“) (Sugasawa et al., 1998). TCR zabezpečuje rýchle a účinné odstránenie poškodení blokujúcich elongáciu transkripcie RNA polymerázou II (Bohr et al., 1985; Mellon et al., 1987; Selby a Sancar, 1993). Táto špecializovaná forma NER, označovaná aj ako oprava spojená s transkripciou alebo preferenčná oprava transkribovaných reťazcov, vyžaduje väčšinu tých istých proteínov ako genómová NER.



Obr. 1.6 Schéma nukleotidovej excíznej opravy. (Prevzaté z Friedberg et al, 1995)

Štúdium preferenčnej opravy transkribovaných reťazcov viedlo pri *E.coli* k objaveniu tzv. transcription-repair coupling factor, TRCF, kódovaného génom *mfd*⁺ (Selby a Sancar, 1991). Ak dôjde počas transkripcie k zastaveniu RNA polymerázy na mieste poškodenia, faktor TRCF sa naviaže na toto miesto, uvoľní RNA polymerázu a syntetizovaný transkript, umožní naviazanie (UvrA)₂(UvrB)₁ komplexu a uskutoční sa NER (Selby a Sancar, 1993). Mutácie v géne *RAD26* *S. cerevisiae* a *CSA* génoch u človeka tiež zodpovedajú za deficiencie v preferenčnej oprave transkribovaných reťazcov (Sweder et al., 1996; Bucheli et al., 2001). TCR je teda dôležitým podporným systémom na opravu

poškodení v aktívnych oblastiach genómu, pre ktoré je GGR príliš pomalá (Sugasawa et al., 1998).

Genetická analýza odhalila pri *S. cerevisiae* veľké množstvo génov spojených s excíznou reparáciou (Haynes a Kunz, 1981; Friedberg, 1988; Friedberg et al., 1991; Prakash a Prakash, 2000; Yu et al., 2001). Mutanty tejto skupiny boli zaradené do epistatickej skupiny *RAD3* (Friedberg et al., 1995). Základnou vlastnosťou tejto epistatickej skupiny je citlivosť na UV žiarenie. Nie všetky mutanty sú rovnako citlivé, čo predpokladá ich rôznu úlohu v reparačnej dráhe. Komplexnosť eukaryotického genómu a štruktúra chromozómov si vyžaduje podstatne viac proteínov zapojených do NER ako pri *E. coli*, avšak podstata opravy je rovnaká. Mutácie v *RAD1-RAD4* a *RAD10* génoch sú zodpovedné za poruchu incízie DNA (Wilcox a Prakash, 1981). Tieto gény sú teda zodpovedné za počiatočnú fázu NER. Okrem toho, mutácia v géne *RAD3* má letálny účinok (Schiestl a Prakash, 1988). Analýza mutantov *rad1* a *rad10* naznačila, že proteínový komplex *Rad1-Rad10* s endonukleázovou aktivitou zohráva úlohu aj v mitotickej rekombinácii a rekombinačnej oprave (Bardwell et al., 1994). V mutantoch ostatných génov zapojených do NER (vid' Tab. 1.2) dochádza k incízii, aj keď so značne redukovanou frekvenciou. Predpokladá sa, že tieto gény len napomáhajú alebo regulujú aktivitu génov *Rad1-4* a *Rad10* (Friedberg et al., 1995).

Na základe doterajších výsledkov sa predpokladá, že aj pri kvasinkách je NER uskutočňovaná prostredníctvom multiproteínového komplexu, tzv. reparozómu, ktorého súčasťou je aj transkripčný iniciačný faktor TFIIH (Friedberg et al., 1995).

Ďalej sa zistilo, že produkty génov *Rad1* a *Rad10* tvoria komplex potrebný pre incíziu DNA, ale tiež sú potrebné pre intrachromozomálnu mitotickú rekombináciu medzi repetitívnymi sekvenciami (Bailly et al., 1992; Bardwell et al., 1992). Komplex má endonukleázovú aktivitu, špecificky rozpoznávajúcu spojenie medzi dsDNA a ssDNA (Bardwell et al., 1994; Tomkinson et al., 1994).

Veľa poznatkov o molekulových mechanizmoch NER sa získava z analýzy klonovaných génov. Samotný *RAD3* gén bol získaný fenotypovou komplementáciou s vysoko citlivým *rad3* mutantom. (Higgins et al., 1983; Naumovski a Friedberg, 1988). Na základe purifikácie bol *RAD3* proteín analyzovaný a charakterizovaný ako

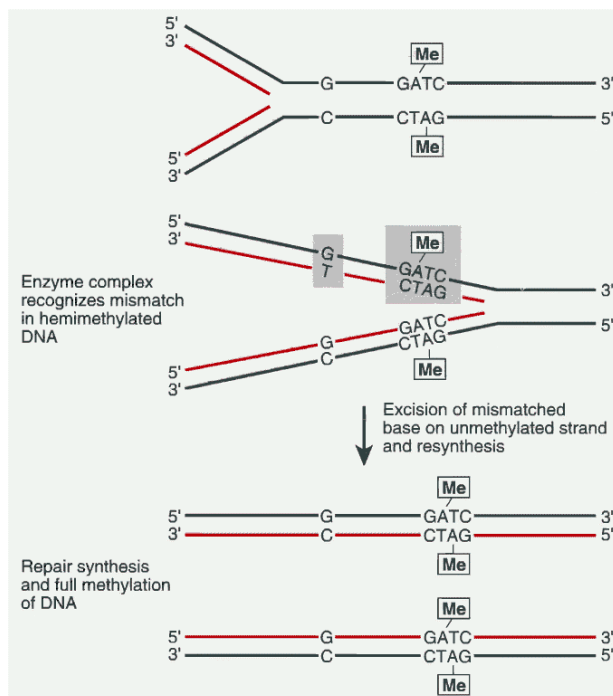
multifunkčný enzým majúci helikázovú a na DNA závislú ATP-ázovú aktivitu (Higgins et al., 1983; Friedberg, 1983; Friedberg, 1988; Guzder et al., 1994).

1.2.2.1.3 Oprava chybné spárovaných báz („mismatch korekcia“)

Mechanizmus tzv. „mismatch korekcie“ je vysoko evolučne konzervovaný od baktérií až po človeka (Jiricny, 1998; Hsieh, 2001). Týmto termínom sa označuje oprava chybné spárovaných báz, ktoré môžu vzniknúť viacerými spôsobmi. Medzi najčastejšie spôsoby vzniku chybné spárovaných báz patria replikačné chyby DNA polymerázy vznikajúce počas replikácie DNA, ktoré uniknú korekčnej („proofreading“) exonukleázovej aktivite DNA polymeráz. V takomto prípade leží chybné spárovaná báza na novosyntetizovanom reťazci a jej oprava zabezpečí udržanie presnosti genetickej informácie. Ďalším mechanizmom vzniku chybné spárovaných báz je tvorba heteroduplexu medzi dvoma homologickými molekulami DNA počas rekombinácie. Chybné spárované bázy vznikajú aj pri deaminácii 5-metylcytosínu alebo vtedy, ak je do DNA vradený chemicky modifikovaný derivát bázy alebo analóg bázy (Lehmann et al., 1996).

Model „mismatch“ opravy pri *E. coli* zahŕňa 10 faktorov (Lahue et al., 1989), z ktorých 3 (MutS, MutH a MutL) participujú výlučne na procese opravy chybné spárovaných báz (Yang, 2000) a ďalších 7 (MutU (UvrD) - DNA helikáza II, Ssb - ssDNA viažuci proteín, ExoI - 3'-5' exonukleáza, RecJ a ExoVII - 5'-3' exonukleázy, DNA polymeráza III a DNA ligáza) sa podieľa aj na ďalších procesoch súvisiacich s metabolizmom DNA (Jiricny, 1998; Leadon a Avrutskaya, 1998). Dôležitú úlohu pri rozpoznaní chybné spárovanej bázy v novosyntetizovanom reťazci DNA zohráva metylácia materského reťazca v GATC sekvenciách (hypometylovaný adenín v polohe 6). Mechanizmus opravy je známy už aj na molekulárnej úrovni (Yang, 2000; Hsieh, 2001). Na MutS homodimér, ktorý rozpoznáva a viaže sa na chybné spárované bázy, sa naviažu MutL a MutH a vytvoria reparačný komplex, ktorý počas ATP-závislej reakcie vytvorí na DNA slučku, tzv. „ α -loop“ (Allen et al., 1997). MutL aktivuje endonukleázovú aktivitu MutH, ktorá štiepi nemetylovaný reťazec DNA v najbližšej hemimetylovanej sekvencii GATC (metylovaný je adenín), ktorá slúži ako rozpoznávací signál (Barras

a Marinus, 1989). Pretože k tejto modifikácii dochádza až po syntéze DNA, sekvencia GATC v novosyntetizovanom reťazci je dočasne nemetylovaná. Až zlom v novosyntetizovanom nemetylovanom reťazci určí, kde prebehne mismatch oprava (Modrich a Lahue, 1996). MutL napomáha 3'→5' DNA helikáze (UvrD) naviazať sa na toto miesto a tá potom rozpletá duplex prednostne smerom k chybne spárovaným bázam (Hall et al., 1998). Exonukleáza potom vyštípe ssDNA nesúcu chybnú bázu a vzniknutá medzera, stabilizovaná Ssb proteínom, je zaplnená DNA polymerázou III a pripojená DNA ligázou k pôvodnému reťazcu.



Obr. 1.7 Wagner-Meselsonov model poreplikačnej mismatch korekcie DNA. (Prevzaté zFriedberg et al , 1995)

Pri eukaryotických organizmoch je mechanizmus „mismatch“ opravy komplexnejší (Iwanejko a Jones, 1998; Harfe a Jinks-Robertson, 2000; Nicholson et al., 2000; Peltomäki, 2001). Pri kvasinkách *S. cerevisiae* mechanizmus „mismatch“ opravy vyžaduje 6 homológov bakteriálneho MutS (MSH1-MSH6) a 4 homológy MutL (MLH1-MLH3 a PMS1) (Harfe a Jinks-Robertson, 2000). Nedoriešenou zostáva otázka rozpoznania novosyntetizovaného reťazca, keďže *S. cerevisiae*, podobne ako *D. melanogaster*, nemetylujú svoju DNA (Leadon a Avrutskaya, 1998). Predpokladá sa,

že rozpoznávacím signálom by mohli byť zárezy medzi 5' a 3' koncami Okazakiho fragmentov na novosyntetizovanom reťazci DNA (Holmes et al., 1990).

1.2.2.2 Rekombinačná oprava

Rekombinačná oprava je potrebná na opravu dvojreťazcových zlomov a na zaplnenie medzier v dcérskych reťazcoch, ktoré vznikajú zastavením DNA polymerázy v mieste poškodenia a perzistujú po replikácii (Pastink et al., 2001). Zistilo sa, že tento systém sa zúčastňuje aj na oprave poškodení indukovaných MNNG (Dolling et al., 1999). Rekombinačná oprava predpokladá prítomnosť dvoch sesterských reťazcov. Procesom rekombinácie je schopná zaplniť medzery v DNA dcérskych reťazcoch. Keďže ako komplementárny reťazec slúži novosyntetizovaný reťazec sesterskej chromatidy (reciproká výmena), výsledná oprava DNA je bezchybná (error-free). Ak sa však použije informácia homologického chromozómu alebo z podobných (nie homologických) oblastí DNA, vzniká možnosť vzniku zmeny a to buď génovej konverzie alebo delécie, duplikácie a translokácie (nereciproká výmena) (Orr-Weaver a Szostak, 1985; Britt, 1996). Samotné poškodenie síce zostáva neopravené, ale bunka je schopná dokončiť replikáciu a poškodenie DNA môže byť opravené excíznou opravou. Preto niektorí autori namiesto termínu rekombinačná oprava, označujú tento proces ako proces tolerovania DNA poškodenia spojený s rekombinačným procesom (Friedberg et al., 1995; Britt, 1996). Presný molekulárny mechanizmus rekombinačnej opravy ešte nie je známy.

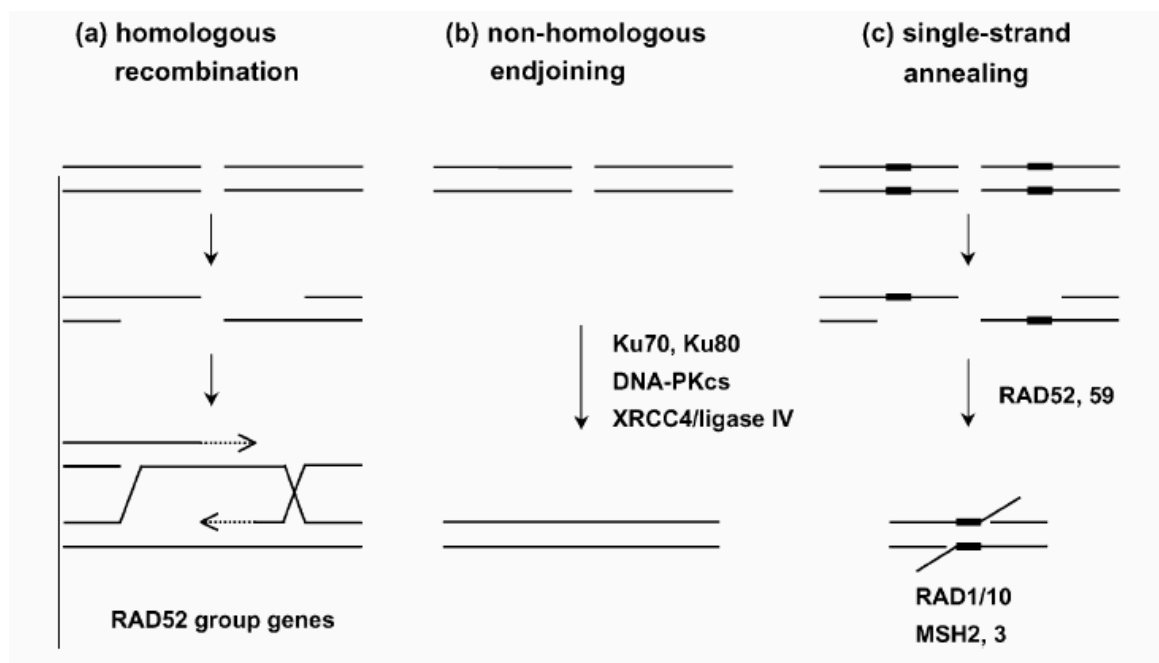
Pri *E. coli* hrá v tomto procese dôležitú úlohu produkt génu *RecA* (Friedberg et al., 1995). Je to multifunkčný proteín, ktorý sa zúčastňuje mnohých dôležitých procesov v bunke. *RecA* proteín bol purifikovaný a zistila sa jeho ATP-ázová aktivita závislá na jednoreťazcovej DNA (ssDNA) (Ogawa et al., 1978). *RecA* proteín sa viaže na jednovláknovú DNA a v komplexe s ňou vyhľadáva homologickú sekvenciu na dvojreťazcovej DNA. *RecBCD* proteín, ktorý má helikázovú a exonukleázovú aktivitu, odvíja DNA duplex od miesta zlomu, degraduje ho z jeho 5' konca, zanechávajúc 3' OH ssDNA. Po spárovaní s homologickou DNA sa vytvorí klasický rekombinačný intermediát známy ako Hollidayova štruktúra (Holliday, 1964) sprostredkovaná proteínmi

RuvA, *RuvB*, *RuvC* a *RecG* (Adams et al., 1994). Na rekombinačnej oprave sa pri *E. coli* zúčastňujú aj ďalšie gény (*recN*, *uvrD*, *recF* a *recJ*) (Shinogara a Ogawa, 1995). Pri rekombinácii dochádza k výmene sesterských reťazcov s veľkosťou až niekoľko kilobáz.

Eukaryotické organizmy disponujú principiálne dvoma základnými reparačnými dráhami na opravu DSB.

1. homologická rekombinácia, v rámci ktorej poškodený úsek DNA získa genetickú informáciu z nepoškodeného homológu (napr. sesterskej chromatidy, homologického chromozómu) (Thacker, 1999)
2. nehomologická oprava alebo tzv. “end-joining”, v ktorej ide o spojenie dvoch DSB bez potreby výraznej sekvenčnej homológie medzi koncami DNA (Kanaar et al., 1998).

Hoci obidve dráhy sú vysoko konzervované od baktérií po človeka, v jednoduchých eukaryotoch, akými sú napr. *S. cerevisiae*, je dominantná homologická rekombinácia, v cicavčích bunkách prevláda pri oprave DSB nehomologická oprava (Takata et al., 1998; Pastink et al., 2001).



Obr. 1.8 Schématické znázornenie mechanizmov zúčastňujúcich sa opravy dvojreťazcových zlomov pri eukaryotoch. a) homologická rekombinácia, b) nehomologická oprava, tzv. end-joining, c) naviazanie jednovláknových úsekov (Prevzaté z Pastink et al.;2001)

V súčasnosti sa ako tretí typ reparačnej dráhy na opravu DSB uvádza tzv. “single-strand annealing” (naviazanie jednovláknových úsekov) (Pastink et al., 2001). Je to vlastne špecifická forma homologickej rekombinácie, ktorá je závislá na prítomnosti repetitívnych sekvencií v okolí DNA poškodenia. Jej výsledkom je delécia úseku DNA nachádzajúcim sa medzi týmito sekvenciami, preto ide o tzv. nekonzervatívny mechanizmus (Pastink et al., 2001).

Kvasinky *S. cerevisiae* sú výborným modelovým objektom pre štúdium rekombinačnej opravy a patria k organizmom, pri ktorých je táto oprava najlepšie preštudovaná. Jedným z hlavných dôvodov je malá veľkosť chromozómov, ktoré sa dajú ľahko izolovať a oprava dvojreťazcových zlomov sa dá detegovať analýzou distribúcie molekulovej hmotnosti chromozomálnej DNA v sacharózovom gradiente.

Pri kvasinkách sú mutanty s poruchou v rekombinančnej oprave zaradené do epistatickej skupiny *RAD52* (Lewis et al., 1999). Mutanty v génoch označených ako *RAD50 - RAD57* vykazujú citlivosť na žiarenie a chemické agensy, ktoré indukujú zlomy na chromozómoch, pričom mutanty *rad51, 52 a 54* sú extrémne citlivé a mutanty ostatných génov vykazujú miernejšiu citlivosť (Haynes a Kunz, 1984; Friedberg, 1988). Produkty týchto génov sa podieľajú na spontánnej a indukovanej mitotickej rekombinácii, meiotickej rekombinácii a na „prepínaní“ párovacieho typu (Haynes a Kunz 1981; Malone, 1983; Orr-Weaver a Sztostak, 1985; Hays et al., 1995; Shinohara a Ogawa, 1995). *Rad52* proteín (52 kDa) interaguje s ssDNA viažúcim proteínom (*Rpa*) a umožňuje naviazanie *Rad51* na ssDNA (Shinohara et al., 1998). Produkt *RAD51* génu (43 kDa) vykazuje funkčnú aj štruktúrnu homológiu s *RecA* proteínom *E. coli* (Ogawa et al., 1993; Baumann a West, 1998) a katalyzuje na ATP závislé homologické párovanie a výmenu sesterských reťazcov DNA (Thacker, 1999). *Rad54* proteín je štruktúrne príbuzný rodine *SWI/SNF2* génov, do ktorej patria DNA helikázy, ale jeho presná funkcia ešte nie je známa (Shinogara a Ogawa, 1995; Clever et al., 1997). Pri štúdiu rekombinačnej opravy boli zistené priame interakcie proteínov *Rad51, Rad52, Rad55, Rad57* a *Rpa*, ktoré vytvárajú multiproteínový komplex, tzv. „rekombinozóm“ (Thacker, 1999).

1.2.2.3 Syntéza DNA cez poškodenie

Syntéza DNA cez poškodenie (translézna syntéza) patrí tiež medzi mechanizmy tolerujúce poškodenie (Friedberg et al., 1995). Je dôležitým bunkovým mechanizmom, ktorý umožňuje prekonať blok v replikácii spôsobený poškodením DNA, ktorý pre bunku znamená vážne ohrozenie životaschopnosti. Niektoré organizmy vlastnia tento indukibilný typ opravy, pomocou ktorej sa môžu vyhnúť letálnemu účinku niektorých poškodení (Kimball, 1987). Najlepšie je preštudovaný SOS systém pri *E. coli*, kde bol opísaný ako tzv. SOS oprava, riadená génmi *recA* a *lexA*, ktorá je spojená so zvýšenou frekvenciou mutácií a je známa aj ako mutagénna alebo error-prone oprava (Liu a Tessman, 1990; Sutton et al., 2000). SOS odpoveď zahŕňa expresiu približne 30 génov, ktoré sú regulované *LexA* a *RecA* proteínmi (Fernandez De Henestroza et al., 2000). Princíp tejto odpovede buniek *E. coli* je už známy aj na molekulárnej úrovni (Little and Mount, 1984). V bunkách *E. coli* s nepoškodenou DNA pôsobí produkt génu *lexA*⁺ ako represor (väzbou na operátorové sekvencie) viac ako 20 génov, vrátane *recA*⁺ a *lexA*⁺. Ak je genóm *E. coli* poškodený alebo je inhibovaná replikácia DNA, vnútrobunkový signál spustí SOS odpoveď. Týmto vnútrobunkovým signálom sú úseky jednovláknovej DNA, ktorá sa objavuje práve vtedy, ak dôjde k zablokovaniu replikácie vplyvom poškodenia DNA alebo iným spôsobom. *RecA* proteín sa v prítomnosti ATP viaže na oblasť jednovláknovej DNA a tým dochádza k jeho aktivácii. Molekuly *LexA* represora interagujú s týmto nukleoproteínovým komplexom (Takahashi a Schnarr, 1989). Výsledkom tejto interakcie je proteolytické štiepenie *LexA* proteínu na presne určenom mieste (Little, 1993), dochádza k jeho inaktivácii ako represora, znižuje sa počet molekúl *LexA* v bunke a naopak zvyšujú sa hladiny produktov génov zodpovedných za SOS odpoveď. Táto aktivita *RecA* proteínu sa nazýva koproteázová, pretože stimuluje samoštiepenie *LexA* represora, čím urýchľuje jeho štiepenie (Walker, 1995). Ak sa jednovláknová DNA postupne vytráca (t.j. poškodenie DNA je odstránené), *RecA* molekuly prestanú byť aktivované a pokračujúca syntéza *LexA* proteínu zvyšuje jeho hladinu v bunke, čo vedie k represii SOS génov a návratu do pôvodného stavu bunky s nízkou hladinou *RecA* proteínu (Friedberg et al., 1995). Pod kontrolou *LexA* represora sú aj gény *dinB* a *umuC, D*, ktoré sa zúčastňujú na tzv. transléznej syntéze (Sutton et al.,

2000). Zistilo sa, že UmuD₂C komplex je DNA polymeráza V, ktorá katalyzuje error-prone transléznú syntézu a replikuje DNA aj cez poškodenie, ktoré by inak pôsobilo ako blok pre replikáciu (Tang et al., 1999; Bridges, 2001; Wang, 2001). *DinB* kóduje DNA polymerázu IV, ktorá sa tiež zúčastňuje na error-prone transléznej syntéze (Wagner et al., 1999).

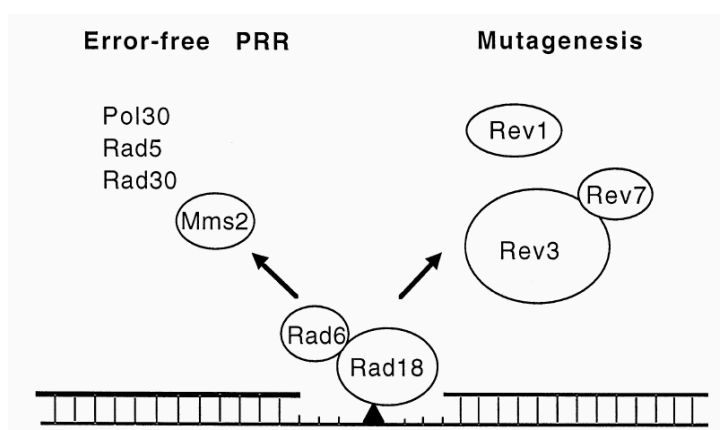
Medzi ďalšie gény zúčastňujúce sa SOS odpovede a regulované *LexA* represorom patria gény excíznej reparačnej dráhy *uvrA*, *uvrB*, *uvrD*, ďalej gény potrebné pre rekombináciu *ruvA*, *ruvB*, *recN* a niektoré gény potrebné pri regulácii bunkového delenia (Friedberg et al., 1995).

Procesy tolerancie DNA pri eukaryotoch sú komplexnejšie a v porovnaní s prokaryotmi oveľa menej preštudované. Najlepšie preštudovaným eukaryotickým modelovým objektom je kvasinka *S. cerevisiae*. Na mutagénnej oprave pri *S. cerevisiae* sa podieľa skupina génov označovaných ako *RAD6* epistatická skupina (Broomfield et al., 2001). Táto skupina je najrozmanitejšou a zároveň najmenej preskúmanou zo všetkých epistatických skupín. Mutanty patriace do *RAD6* skupiny sú citlivé na UV- a X-žiarenie, alkylačné agensy a látky spôsobujúce krížové väzby a majú defekt v indukovanej mutagenéze (Friedberg et al., 1991).

Hlavným predstaviteľom tejto skupiny je *RAD6* gén. *rad6* mutanty majú charakteristický pleiotropný fenotyp, vykazujú citlivosť k rôznym DNA poškodzujúcim agensom zahŕňajúcim UV- a X-žiarenie, alkylačné agensy a látky indukujúce krížové väzby a majú redukovanú indukovanú, avšak zvýšenú spontánnu mutabilitu a spomalený rast (Bailly et al., 1997). Produktom *RAD6* génu je ubiquitín konjugačný enzým (20 kDa) (Jentsch et al., 1987), ktorý vytvára komplex s *Rad18* proteínom (Bailly et al., 1997). Mutanty *rad18* sú citlivé na UV-, X-žiarenie a alkylačné látky, avšak nemajú poruchu v indukovanej mutabilite (Friedberg et al., 1991). Produktom tohto génu je väzbový proteín s afinitou k ssDNA (Chanet et al., 1988). Predpokladá sa, že *Rad18* proteín svojou ssDNA väzbovou aktivitou usmerňuje *Rad6* proteín na miesto poškodenia (Bailly et al., 1994).

Pre transléznú „mutagénnu“ syntézu cez poškodenie sú potrebné produkty génov *REV1*, *REV3* a *REV7* (Budd a Campbell, 1997). *REV3* gén vykazuje vysokú sekvenčnú homológiu s génmi pre polymerázy δ a ϵ . Mutanty *rev3* sú citlivé k UV-žiarieniu

a nevykazujú žiadnu indukovanú mutabilitu. Nedávno bolo dokázané, že *REV3* gén kóduje DNA polymerázu, ktorá vyžaduje proteín *Rev7* ako esenciálnu podjednotku a tento enzým bol označený DNA polymeráza ζ (Singhal et al., 1992; Nelson et al., 1996). *REV1* gén kóduje proteín homologický s *UmuC* proteínom *E.coli* a je ďalším kandidátom pre transléznú syntézu (Larimer et al., 1989).



Obr. 1.9 Predpokladaný model dvoch alternatívnych subdráh *RAD6* reparačnej dráhy pri *S. cerevisiae*. (Prevzaté z Xiao et al., 1999)

Okrem doteraz spomínaných génov patria do tejto epistatickej skupiny aj gény *RAD5*, *CDC7*, *CDC8*, *SRS2* (*RADH*) (Liefshitz et al., 1998) a gény *RAD9* a *RAD24*, ktoré sa zúčastňujú na regulácii bunkového cyklu pri poškodení DNA (Friedberg et al., 1995). Podrobnejšie sa o *RAD9* géne zmienime v nasledujúcej kapitole.

V súčasnosti je však známy aj ďalší typ translézneho syntézy, tzv. error-free alebo presná translézna syntéza (Bridges, 2001; Wang, 2001). V tejto súvislosti sa ako zaujímavý javí mutant *rad30 S. cerevisiae*. *Rad30* je homológom génov *dinB* a *umuC E. coli* a *REV1 S. cerevisiae* (Johnson et al., 1999). Zistilo sa, že gén *Rad30* kóduje DNA polymerázu η , ktorá je potrebná pre mutagénnu transléznú syntézu poškodení indukovaných po pôsobení MNNG, ale aj pre bezchybnú opravu poškodení indukovaných po pôsobení UV žiarenia (Broomfield et al., 2001). Pol η je teda error-free alebo error-prone DNA polymerázou v závislosti od typu poškodenia.

Pri kvasinkách *S. cerevisiae* boli identifikované aj ďalšie gény zúčastňujúce sa presnej, error-free postreplikačnej opravy – *mms2*, *ubc13*, *rad5* a *pol30* (Xiao et al., 1999; Broomfield et al., 2001).

Homológy kvasinkových génov zúčastňujúcich sa error-prone alebo error-free postreplikačnej opravy boli nájdené aj pri vyšších eukaryotoch, vrátane človeka (Lin et al., 1999; Sloun et al., 1999; Johnson et al., 2000; Zhang et al., 2000).

Pri fotoautotrofných organizmoch ešte nie je preštudovaný systém analogický mutagénnej oprave pri kvasinkách (Britt, 1996).

1.3 Reparačné mechanizmy *Chlamydomonas reinhardtii*

Štúdium v oblasti reparačných mechanizmov fotoautotrofných organizmov nedosahuje úroveň poznatkov pri heterotrofoch. Doteraz je známych len málo presných informácií o enzymológii, biochémií a molekulárnej podstate proteínov a ďalších zložiek reparačných mechanizmov (Britt, 1996). Pri fotoautotrofných organizmoch sú riasy *Chlamydomonas reinhardtii* atraktívnym modelovým objektom pre štúdium opravy DNA.

Pri *C. reinhardtii* sa po pôsobení UV žiarenia pozorovala účinná fotoreparácia jadrovej i chloroplastovej DNA (Small a Greinmann, 1977). Bolo dokázané, že k inaktivácii jadrovej DNA fotolyázy dochádza, ak sú bunky *C. reinhardtii* po ožiení UV žiarením (254nm) kultivované 24 hodín v tme. Avšak pyrimidínové diméry v chloroplastovej DNA sú odstraňované fotoreparáciou aj po 24-hodinovej kultivácii v tme (Small, 1980; Small, 1987). Na základe týchto pozorovaní bola vyslovená hypotéza, že DNA fotolyázy v jadre a chloroplaste by mohli byť dva rozdielne enzýmy kódované dvoma odlišnými štruktúrnymi génmi (Cox a Small, 1985).

Cox a Small izolovali dvoch mutantov (*phr1* a *phr2*) s narušenou fotoreparáciou pyrimidínových dimérov jadrovej DNA, ale pri chloroplastovej DNA je efektívnosť podobná štandardnému typu (Cox a Small, 1985). Small ďalej zistil, že *phr1* nie je mutáciou štruktúrneho génu pre DNA fotolyázu, ale ide pravdepodobne o mutáciu regulačného génu tohto enzýmu (Small, 1993). Ďalší mutant s poruchou jadrovej fotoreaktívácie bol označený *phr2* (Cox a Small, 1985). Na základe genetickej a molekulárnej analýzy týchto dvoch mutantov sa zistilo, že pravdepodobne ide o heteroalely jedného génu (Miadoková et al., 1991; Munce et al., 1993). Izolácia

mutanta s poruchou len v jadrovej fotoreaktivácii podporila myšlienku existencie dvoch rôznych štruktúrnych génov pre DNA fotolyázu. Petersen et al. (1999) pomocou molekulárnych metód hľadali v genóme *C. reinhardtii* sekvenciu kódujúcu DNA fotolyázu triedy II. Podarilo sa im izolovať *PHR2* gén z *C. reinhardtii*, ktorý kóduje DNA fotolyázu triedy II (Petersen et al., 1999). Nesie signálnu sekvenciu pre lokalizáciu v chloroplaste a predpokladá sa, že ide o DNA fotolyázu funkčnú v chloroplaste (Petersen et al., 1999).

V súvislosti s fotoautotrofiou sa pri riasach predpokladá zložitejšia regulácia a prepojenie procesov opravy na svetle s inými esenciálnymi bunkovými procesmi, než pri heterotrofoch (Ahmad a Cashmore, 1993). DNA fotolyáza riasy *C. reinhardtii*, podobne ako DNA fotolyázy skôr spomínaných organizmov (Sancar et al., 1984a; Sancar a Smith, 1989), stimuluje opravné procesy nezávislé od svetla (dark repair). Avšak v kontraste s výsledkami získanými pri baktériách a kvasinkách, DNA fotolyáza rias stimuluje aj iný/iné opravy ako je excízna oprava (Vlček et al., 1995).

Pri *Chlamydomonas reinhardtii* nebola zistená prítomnosť alkyltransferázy (Frost a Small, 1987). Frost a Small zistili, že pri týchto riasach ani po 30 hodinách kultivácie po ovplyvnení alkylačnou látkou nedochádza k odstráneniu O⁶metylguanínu. To by mohlo znamenať, že *C. reinhardtii* postráda reparačný systém pre O⁶metylguanín. Keďže sa však aktivita alkyltransferázy napr. pri *S. cerevisiae* (v roku 1990), *Aspergillus nidulans* (v roku 1992) (pozri: Friedberg et al., 1995) a pri iných organizmoch zistila len nedávno, je možné, že aj pri riasach bude tiež dokázaná prítomnosť tohto enzýmu. Doteraz však pri riasach nie je známy žiaden špecifický spôsob opravy poškodení DNA indukovaných alkylačnými látkami a ani inými chemickými látkami. Najcitlivejšími na pôsobenie týchto látok sa javia mutanty s poruchou v rekombinačnej oprave, čo naznačuje, že pri riasach tento typ opravy hrá dôležitú úlohu v odstraňovaní poškodení spôsobených chemomutagénmi (Miadoková et al., 1994).

Hoci prvé pokusy pri riasach naznačili, že excízna oprava pri *C. reinhardtii* neprebíha (Swinton a Hanawalt, 1973), neskôr Small a Greimannová (1977a) modifikovali metodiku detekcie pyrimidínových dimérov a analýzy DNA po ovplyvnení UV žiarením a dokázali prítomnosť excíznej opravy pri štandardnom kmeni *C. reinhardtii* v jadrovej i mimojadrovej DNA (Small a Greimann, 1977a,b). Davies

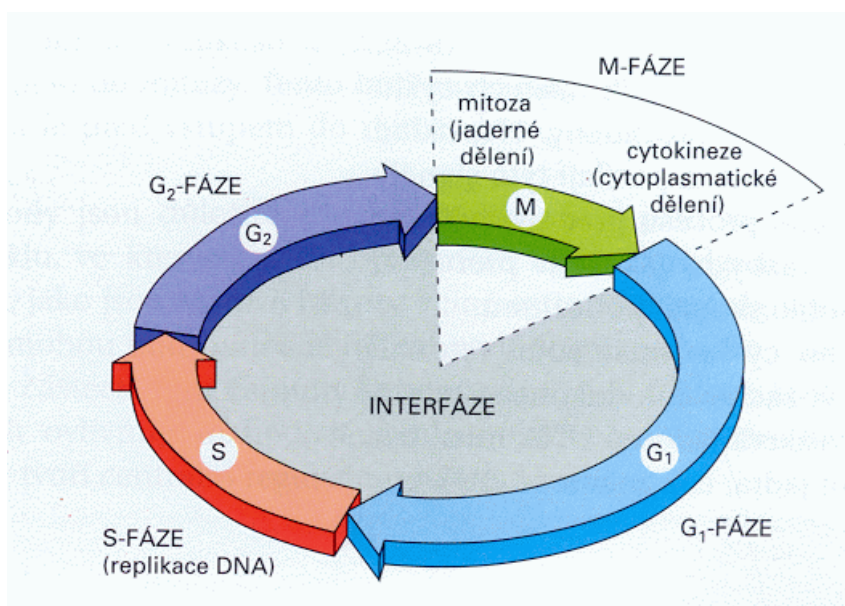
(1967) izoloval mutanta *uvs1*, pri ktorom bola dokázaná úplná strata excíznej opravy, čím sa potvrdila existencia mutantov tohto typu aj pri zelených riasach (Small, 1987). Z týchto pokusov súčasne vyplynulo, že v chloroplastovej DNA sú diméry odstraňované excíziou pri štandardnom type aj pri *uvs1* kmeni, čo naznačuje nezávislú kontrolu tohto opravného systému v jadrovej a chloroplastovej DNA (Small, 1987). Medzi excízne-deficitné mutanty ďalej patria kmene *uvs6* (Davies, 1967), *uvs9* (Small, 1987), *uvs12* a *uvs15* (Podstavková et al., 1992; Miadoková et al., 1995; Vlček et al., 1997).

Pri fotoautotrofných organizmoch doteraz nebola potvrdená existencia "mismatch" korekcie (Britt, 1996). Pri riasach *C. reinhardtii* bol izolovaný mutantný kmeň *uvs14*, pri ktorom bola zistená zvýšená hladina spontánnej aj indukovanej mutability (Vlček et al., 1997). Tieto výsledky naznačili, že pri tomto kmeni by mohlo ísť o poruchu "mismatch" korekcie, avšak jednoznačný dôkaz v súčasnosti ešte nie je k dispozícii.

Aj pri *C. reinhardtii* boli získané kmene, pri ktorých sa predpokladá narušený rekombinačný reparačný mechanizmus. Rosen a Ebersold (1972) izolovali mutanta *uvsE1*, ktorý súčasne vykazoval zníženú frekvenciu meiotickej rekombinácie medzi sledovanými genetickými markermi. Na základe analógie z *rec⁻* mutantnými kmeňmi pri *E. coli*, predpokladali pri tomto kmeni narušený rekombinačný reparačný mechanizmus. Svoj predpoklad potvrdili nepriamym dôkazom, založeným na štúdiu interakcie kofeínu a reparačných systémov. Portney a Rosen (1980) zistili, že subletálne dávky kofeínu pri *C. reinhardtii* zvyšujú prežívanie po pôsobení UV žiarenia a na základe tohto pozorovania usúdili, že subletálne dávky kofeínu pri *C. reinhardtii* stimulujú proces rekombinácie. Pri kmeni *uvsE1* kofeín neovplyvnil prežívanie buniek. Toto viedlo ku konštatovaniu, že pridanie kofeínu do postiradiačného média sa môže využiť ako test na detekciu rekombinačne deficitných kmeňov. Ďalšími rekombinačne-deficitnými mutantami sú kmene *uvsE5* a *uvsE6* (Rosen a Ebersold, 1972) a *uvs10* (Vlček et al., 1987). Vyššia citlivosť dvojitéch mutantov (*uvsE1uvsE5*, *uvsE1uvsE6*, *uvsE5uvsE6*) v porovnaní s jednoduchými mutantami naznačuje, že ide o narušenie rozdielnych subdráh rekombinančnej opravy.

1.4 Zastavenie bunkového cyklu ako odpoveď na poškodenie DNA

Bunkový cyklus zahŕňa sériu udalostí, ktoré vedú k presnému prenosu genetického materiálu do dcérskych buniek. Vo všeobecnosti sa ním označuje časový interval medzi dvoma deleniami bunky, pozostávajúci z viacerých na seba nadväzujúcich fáz, označovaných G₁, S, G₂ a M (Obr. 1.10). Každá fáza je charakteristická určitými procesmi (Alberts et al., 1998). Reguláciu bunkového cyklu zabezpečujú cyklín-dependentné kinázy (CDK) aktívované alebo inaktívované pomocou periodicky exprimovaných cyklínov. Najvyššia koncentrácia cyklínov bola nameraná v G₁ a G₂ fáze (Hartwell a Kastan, 1994).



Obr. 1.10 Fázy bunkového cyklu. Interfáza je obdobím bunkového rastu, v ktorej dochádza aj k replikácii DNA (počas S-fázy). V priebehu M-fázy sa jadro a neskôr aj cytoplazma rozdeľujú. (Prevzaté z Alberts et al., 1998)

Prítomnosť DNA poškodení alebo tiež aj nezreplikovanej DNA môže spôsobiť dočasné zastavenie bunkového cyklu (Murray, 1992; Weinert a Lydall, 1993), ktoré zabezpečí pre bunku čas potrebný na opravu poškodenia a dokončenie krokov potrebných na prechod z jednej fázy bunkového cyklu do druhej a zvýši tak pravdepodobnosť prežitia bunky (Fasullo et al., 1998). K zastaveniu bunkového cyklu dochádza v určitých bodoch, ktoré

sa označujú ako kontrolné body bunkového cyklu, ktoré kontrolujú vstup do S a M fázy predlžujúc G1 a G2 fázu pre opravu DNA (Weinert a Hartwell, 1988; Hartwell a Weinert, 1990). Zablokovanie bunky v G1 fáze znemožní replikáciu poškodenej DNA, zastavenie cyklu v G2 fáze blokuje vstup do mitózy. V súčasnosti sú známe ďalšie dva kontrolné body, intra-S a M, blokujúce prechod z metafázy do anafázy (Yang et al., 1997; Gardner et al., 1999). Proteíny jednotlivých kontrolných bodov sa zúčastňujú na regulácii transkripcie, indukcii opravy DNA, zablokovaní a odblokovaní bunkového cyklu atď. Mutácie týchto proteínov môžu mať pre bunku katastrofálne následky, vedú k zníženej životaschopnosti buniek a v niektorých prípadoch môžu viesť až k transformácii bunky a vzniku rakovinových buniek (Hartwell, 1992; Lane, 1992; Elledge, 1996; Paciotti et al., 1998). U človeka Bloomov syndróm a ataxia telangiectasia sú charakteristické práve takouto neschopnosťou bunky zastaviť bunkový cyklus v kontrolnom bode v G1 fáze (Kastan et al., 1992; Khanna a Lavin, 1993).

Dôkazy o vysokej evolučnej konzervovanosti reparačných mechanizmov, ale aj mechanizmov regulácie bunkového cyklu pri eukaryotických organizmoch, umožnili využiť kvasinku *S. cerevisiae* ako modelový objekt na štúdium molekulárnych mechanizmov zastavenia bunkového cyklu ako aj na získanie dôkazov o dôležitosti tohto zastavenia v prítomnosti DNA poškodení (Rhind a Russell, 1998; Weinert, 1998; Lowndes a Murguia, 2000).

1.4.1 Úloha *RAD9* génu

Jednu z kľúčových úloh v zastavení bunkového cyklu v prítomnosti DNA poškodenia pri kvasinkách zohráva produkt génu *RAD9* (Siede et al., 1993). Úloha *RAD9* ako kontrolného bodu sa sledovala na základe porovnania fenotypu *rad9* mutantov s bunkami štandardného typu. Ak neboli bunky *rad9* ožiarené, dĺžka bunkového cyklu ani prežívanie *rad9* mutantu sa nelíšilo od štandardného kmeňa. Jediným známym fenotypom *rad9* mutantov je to, že v bunkách *rad9* častejšie dochádza k spontánnym stratám chromozómov. V bunkách kvasiniek a cicavcov je frekvencia straty chromozómov menej ako 10^{-5} na jedno bunkové delenie. Pri *rad9* mutantoch sa táto frekvencia zvyšuje 7-21 -

krát (Weinert a Hartwell, 1990). Ak boli bunky ovplyvnené X-žiarením, bunky štandardného kmeňa zastavili bunkový cyklus v G₂ fáze, zatiaľčo bunky *rad9* mutanta pokračovali v delení bez zastavenia a po niekoľkých deleniach odumreli (Weinert a Hartwell, 1988; Hartwell a Weinert, 1989). Mutanty *rad9* inkubované istý čas po ovplyvnení X-žiarením v médiu obsahujúcom mikrotubulový jed vykazovali prežívanie na úrovni štandardného kmeňa (Weinert a Hartwell, 1988). Toto pozorovanie naznačilo, že *RAD9* gén nie je priamo zahrnutý v oprave DNA, ale skôr pôsobí ako kontrolný bod, ktorý v prítomnosti DNA poškodení v bunke dokáže zastaviť bunkový cyklus a získať čas potrebný na opravu poškodení DNA alebo dokončenie replikácie.

RAD9 gén bol klonovaný a sekvenovaný. Kóduje mRNA s dĺžkou 4,2 kb. *Rad9* proteín má 1309 aminokyselín a molekulovú hmotnosť 148,412 Da (Schiestl et al., 1989).

RAD9 gén nemá vplyv na spontánnu, ale má vplyv na UV-indukovanú mutagenézu (Paulovich et al., 1998). V porovnaní so štandardným typom má *rad9* mutant nezmenenú rekombináciu (Schiestl et al., 1989; Weinert a Hartwell, 1990), rovnakú sporuláciu a životaschopnosť spór (Dowling et al., 1985; Weber a Byers, 1992) a rovnakú účinnosť opravy DNA v nedeliacich sa bunkách (Weinert a Hartwell, 1990). Zistilo sa tiež, že mutanty *rad9* vykazujú citlivosť voči alkylačným látkam a peroxidu vodíka (Paulovich et al., 1997; Flattery-O'Brien a Dawes, 1998). Produkt *RAD9* génu je potrebný pre X-žiarením indukované zastavenie bunkového cyklu v G₂ fáze pri *rad52* mutantoch, ktoré sú deficientné v oprave DSB (dvojreťazcových zlomov) (Friedberg et al., 1995). Prežívanie dvojitého mutanta *rad52rad9* po ovplyvnení X-žiarením je výrazne nižšie ako prežívanie jednoduchého mutanta *rad52*. Už relatívne malé dávky žiarenia (2 krad) vedú k odumieraniu buniek, pričom ich fenotyp zodpovedá ireverzibilnému zablokovaniu v G₂ fáze. Okrem toho je produkt *RAD9* nevyhnutný na zastavenie bunkového cyklu pri *cdc2*, *cdc3*, *cdc9*, *cdc13* a *cdc17* mutantoch, ktoré majú poruchu v génoch potrebných na replikáciu DNA (Schiestl et al., 1989, Weinert a Hartwell, 1993). Tieto výsledky naznačujú, že SSB (jednoreťazcové zlomy) a DSB poskytujú signál na zastavenie bunkového cyklu sprostredkované produktom *RAD9* génu. Keďže takéto zastavenie neindukuje proteosyntézu, predpokladá sa, že je dôsledkom postranlačnej modifikácie proteínu zodpovedného za prechod medzi S a M fázou (Weinert a Hartwell, 1990). Predpokladá sa aj funkcia *RAD9* génu v signálnej dráhe, ktorá hrá úlohu v G₁ fáze

bunkového cyklu (Siede et al., 1993; Aboussekra et al., 1996). Pre prechod do S a M fázy bunkového cyklu je nevyhnutná proteín-kináza kódovaná *CDC28* génom, ktorá je pravdepodobne cieľovým proteínom postranlačnej úpravy sprostredkovanej produktom *RAD9* génu (Siede et al., 1993). Avšak presný molekulárny mechanizmus účinku *RAD9* génu ešte nie je známy.

Bunky *rad9* mutantov možno odlíšiť od buniek štandardného kmeňa aj na základe morfológie deliacich sa buniek po pôsobení mutagénu. Ako už bolo vyššie uvedené, štandardné bunky po pôsobení X-žiarenia zastavia bunkový cyklus v G_2 fáze. Morfológicky tomuto štádiu zodpovedá veľká bunka s jedným, maximálne dvoma púčikmi a s veľkým, predĺženým, nerozdeleným jadrom, umiestneným na rozhraní materskej bunky a púčika, resp. púčikov. Bunky, pri ktorých došlo k oprave poškodenej DNA, sa po niekoľkých hodinách začnú deliť a dávajú vznik veľkým, životaschopným kolóniám. Bunky, ktoré nie sú schopné opravy, sú ireverzibilne zablokované v G_2 fáze a odumierajú v štádiu jednej bunky. Bunky s poruchou v regulácii bunkového cyklu (*rad9* mutant) po pôsobení X-žiarenia nezablokujú G_2 fázu bunkového cyklu a prejdú do mitózy. Keďže nedochádza k efektívnej oprave DNA, bunky po niekoľkých deleniach odumierajú v dôsledku neschopnosti tolerovať poškodenie DNA. Výsledkom takéhoto delenia sú mikrokolónie pozostávajúce z 3 až 8 buniek (Weinert a Hartwell, 1988).

1.4.2 Mutanty s predpokladanou poruchou zastavenia bunkového cyklu ako odpovede na poškodenie DNA pri *C. reinhardtii*

Prvým mutantom, ktorý naznačil možný vzájomný vzťah medzi poškodením DNA a reguláciou bunkového cyklu pri riasach, bol mutant *uvr1*, ktorý vykazuje zvýšenú rezistenciu voči UV-žiareniu v porovnaní so štandardným kmeňom. Pri štúdiu tohto mutantu sa zistilo, že k zvýšenej rezistencii voči UV-žiareniu by mohlo dochádzať následkom predĺženia bunkového cyklu oproti dĺžke bunkového cyklu pri štandardného kmeni. Toto predĺženie sa prejavovalo posunom začiatku a ukončenia syntézy DNA, karyokinézy, zväčšovania objemov a počtu uvoľnených dcérskych buniek (zoospór)

z pôvodných materských (Vlček et al., 1981). Takéto predĺženie by pre bunku znamenalo získanie času na opravu poškodení indukovaných UV-žiarením.

Pri *C. reinhardtii* sa izoloval aj kmeň *uvs11*, pri ktorom sa v porovnaní so štandardným typom zistila zvýšená citlivosť na UV-žiarenie, MNNG a takisto aj zvýšená frekvencia priamych mutácií vedúcich k rezistencii na streptomycín (Vlček et al., 1987; Miadoková et al., 1994). Bunky mutantného kmeňa *uvs11* ovplyvnené mutagénom (UV, MNNG) sa rozdelia pred odumretím minimálne jedenkrát, následkom čoho vznikajú mikrokolonie s neživotoschopnými bunkami (Vlček et al., 1987). Podstata poruchy mutácie *uvs11* zatiaľ nie je známa, avšak doterajšie výsledky (fenotypový prejav po pôsobení UV-žiarenia a MNNG, tvorba mikrokolónií) naznačujú, že ide o mutáciu v géne sprostredkujúcom prepojenie medzi poškodením DNA a reguláciou bunkového cyklu, podobne ako pri *rad9* mutantnom kmeni kvasiniek *S. cerevisiae*.

Kapitola 2

Transformácia jadrového genómu *Chlamydomonas reinhardtii*

V predchádzajúcich kapitolách sme opísali mnoho mutantov zúčastňujúcich sa na oprave DNA pri *C. reinhardtii*. Niektoré gény zapojené do opravy DNA boli na základe klasických genetických metód mapované a charakterizované (Davies, 1967; Vlček et al., 1981; Vlček et al., 1987; Podstavková et al., 1991; Vlček et al., 1991; Podstavková et al., 1992; Miadoková et al., 1994; Vlček et al., 1997). Avšak dodnes nie sú známe produkty týchto génov a taktiež ich presná funkcia v procese opravy DNA. Jednou z metód, ktorá by mohla prispieť k rýchlejšiemu napredovaniu výskumu v oblasti reparačných mechanizmov pri fotoautotrofných organizmoch na príklade jednobunkovej zelenej riasy *C. reinhardtii*, je úspešná transformácia jadrového genómu.

Hlavnými problémami pri transformácii buniek *C. reinhardtii* je prítomnosť bunkovej steny a rozsiahly chloroplast prekrývajúci centrálné umiestnené jadro. Pri prvých pokusoch o jadrovú transformáciu *C. reinhardtii* boli použité cudzorodé - bakteriálne a kvasinkové gény. Kvasinkový gén *ARG4*, kódujúci arginínsukcinátlyázu, komplementoval mutáciu *arg7* pri riasach, avšak transformačná účinnosť nebola vyššia ako frekvencia reverzií v tomto lokuse (10^{-6} - 10^{-7}) (Rochaix a vanDillewijn, 1982). Okrem toho transformanty rástli oveľa pomalšie a vykazovali len 5 % aktivity arginínsukcinátlyázy v porovnaní s divým typom. DNA transformantov hybridizovala

s plazmidovou DNA, čo slúžilo ako dôkaz, že plazmidová DNA sa včlenila do genetického materiálu bunky. Neskôr sa uskutočnili pokusy, pri ktorých bol do vektora nesúceho kvasinkový *ARG4* gén vložený počiatok replikácie izolovaný z chloroplastového genómu (Rochaix et al., 1984). Získali sa tak transformanty, ktoré niesli plazmid v neintegrovanom stave. Tento plazmid sa však za neselektívnych podmienok veľmi rýchlo vytrácal z buniek a navyše zavedenie počiatku replikácie do vektora nevedlo k zvýšeniu účinnosti transformácie, čo naznačilo, že integrácia vektora do genómu nie je limitujúcim faktorom pre zvýšenie účinnosti.

Pri ďalšom pokuse o transformáciu bol použitý *nptII* gén z baktérie *E.coli* (kódujúci neomycín fosfotransferázu), ktorý zabezpečoval rezistenciu voči kanamycínu a geneticínu a navyše sa javil ako vhodný dominantný selekčný marker (Hasnain et al., 1985). Expresia tohto génu bola riadená promótorom z vírusu SV40 vo vektore, ktorý niesol počiatok replikácie z 2 μ m plazmidu kvasiniek. Plazmid po transformácii zostával v neintegrovanom stave a účinnosť transformácie bola 10^{-6} . Zistilo sa však, že pri riasach dochádza často k vzniku spontánnej rezistencie voči kanamycínu a geneticínu a preto sa tento marker prestal používať.

Jedným z limitujúcich faktorov pre úspešnú transformáciu pri riasach, podobne ako pri vyšších rastlinách, je prítomnosť bunkovej steny, ktorá tvorí významnú bariéru pre zavedenie cudzorodej DNA. Preto sa pri transformácii využívali najmä mutanty bez bunkovej steny - a to buď mutant (*cw15*) alebo bunky, ktorých bunková stena bola degradovaná autolyzínom - druhovo špecifickým enzýmom degradujúcim bunkovú stenu počas párovania gamét *C. reinhardtii*.

Významný pokrok v štúdiu transformácie *C. reinhardtii* nastal až po zavedení selektívnych markerov izolovaných priamo z *C. reinhardtii* a vyvinutí účinných techník na zavedenie DNA do jadra.

2.1 Selektívne markery

Keďže sa pri riasach stretávame s problémami pri expresii cudzorodých génov (Hall et al., 1993), nedostatok vhodných selekčných markerov bol dlho jedným z limitujúcich

obmedzení pre úspešnú transformáciu. Tento problém bol prekonaný po zavedení selekčných markerov izolovaných priamo z *C. reinhardtii* (Kindle et al., 1989). Najvhodnejšími selekčnými markermi sú tie, ktoré umožňujú ľahkú fenotypovú selekciu, pri ktorej rastú len kolónie transformovaných buniek a frekvencia reverzií alebo vzniku spontánnej rezistencie je čo najnižšia. Ako najvýhodnejšie sa preto používajú gény komplementujúce auxotrofné mutácie rias, pri ktorých sa dosahuje najvyššia účinnosť transformácie. V poslednom čase sa ako selekčný marker využívajú gény vedúce k rezistencii voči antibiotikám.

2.1.1 Markery komplementujúce mutácie *C. reinhardtii*

Jedným z prvých selekčných markerov, ktoré boli použité pri transformácii *C. reinhardtii*, je *Arg7* gén. Kóduje arginínsukcinátlyázu, ktorá katalyzuje poslednú reakciu v biosyntéze arginínu. Gén je lokalizovaný v I. väzbovej skupine (Matagne, 1978), zaberá 7 kb a je prerušený 12 intrónmi (Debuchy et al., 1989; Purton a Rochaix, 1994). Komplementuje *arg7* a *arg2* mutácie a transformanty sú selektované na médiu postrádajúcom arginín. Inzercia fragmentu dlhého 400 bp z baktériofága Φ X174 do jedného z intrónov poskytuje molekulárny marker na dôkaz *Arg7* transformantov (Gumpel a Purton, 1994). Bol skonštruovaný *Arg7* kozmid, ktorý sa použil na vytvorenie genómovej knižnice s 8×10^5 nezávislými klonmi reprezentujúcimi približne 250 genómových ekvivalentov (Purton a Rochaix, 1994). Nahradením *ARG7* promótoru promótorom z baktériofága T7 bol skonštruovaný tzv. shuttle vektor, schopný komplementovať *arg7* mutáciu *C. reinhardtii* a tiež *argH* mutáciu *E.coli* (Auchincloss et al., 1999).

Ďalším génom, ktorý sa pri *C. reinhardtii* používa ako selekčný marker, je gén *Nit1* kódujúci nitrát reduktázu. Tento gén umožňuje bunkám rásť na médiu obsahujúcom nitrátové ióny ako jediný zdroj uhlíka, ktorý nedokážu využiť auxotrofné mutanty v *nit1* géne (Fernandez et al., 1989; Kindle et al., 1989; Blankenship a Kindle, 1992). Gén obsahuje 15 intrónov a zaberá oblasť dlhú 8,5 kb. Génom *Nit1* je možné transformovať kmeň *nit1NIT2*, pretože *Nit2* je regulačným génom, ktorý je potrebný na expresiu *Nit1*

(Schnell a Lefebvre, 1993). Väčšina kmeňov *C. reinhardtii* je izolovaná zo štandardného typu, ktorý nesie mutácie *nit1* a *nit2* a preto teda nie sú vhodné na transformáciu s *Nit1* génom (Harris, 1989).

Medzi ďalšie selekčné markery patria gény *Nic7*, *Thi10* a iné. *Nic7* gén komplementuje mutáciu vyžadujúcu nikotínamid (Ferris, 1995). Jeho výhodou je nízka frekvencia reverzií. *Thi10* gén komplementuje tiamínovú auxotrofiu, avšak jeho nevýhodou je, že netransformované bunky odumierajú veľmi pomaly (Ferris, 1995).

2.1.2 Markery nesúce rezistenciu na antibiotiká

Hlavnou výhodou týchto markerov, oproti vyššie spomínaným, je možnosť ich použitia pri akomkoľvek génovom pozadí, takže nie je potrebné konštruovať recipientné kmene. Medzi takéto markery patrí gén *Cry1*, ktorý zabezpečuje rezistenciu voči cytosolickým inhibítorm translácie kryptopleurínu a emetínu, vďaka missense mutácii v kódujúcej oblasti pre cytosolický ribozomálny proteín S14. Ide o dominantný selektívny marker (Nelson et al., 1994). Do tejto skupiny markerov patria aj mnohé ďalšie gény, napr. bakteriálny gén *nptII* nesúci rezistenciu na aminoglykozidázové antibiotiká, *aadA* gén *E.coli* kódujúci aminoglykozid adenín transferázu, umožňujúcu rezistenciu na spektinomycín a streptomycín (Cerutti et al., 1997) atď. Počet týchto markerov sa však ešte určite zvýši, pretože v tejto oblasti prebiehajú intenzívne výskumy.

2.2 Metódy na zavedenie DNA do jadrového genómu

C. reinhardtii

Dodnes boli vyvinuté tri rôzne metódy na transformáciu *C. reinhardtii*, z ktorých každá má svoje výhody i nevýhody (Kindle, 1998).

2.2.1 Bombardovanie

Účinná transformácia bola pri riasach po prvýkrát opísaná pri využití bombardovania pomocou wolframových partikul (Debuchy et al., 1989; Kindle et al., 1989; Mayfield a Kindle, 1990). Pri tejto metóde je DNA precipitovaná na povrch malých partikul (najčastejšie wolfrámových) a pod tlakom vystrelená na bunky na povrchu Petriho misky. Pomocou bombardovania je možné získať až 200 transformantov na Petriho misku (približne 3×10^3) (Kindle et al., 1989). Táto metóda je vhodná na transformáciu buniek *C. reinhardtii* s neporušenou bunkovou stenou a preto sa veľmi často používa a to nielen pri transformácii jadrového, ale i chloroplastového a mitochondriálneho genómu.

2.2.2 Elektroporácia

Elektroporácia je metóda, pri ktorej sa exogénna DNA vnesie do jadra pomocou elektrického výboja. Umožňuje transformovať aj bunky s bunkovou stenou (Brown et al., 1991). Pôvodne nízka transformačná účinnosť (10^{-7} /bunku) sa v súčasnosti vďaka optimalizácii transformačných podmienok (osmolarita transformačného média, teplota, koncentrácia pDNA, intenzita elektrického poľa) zvýšila až na $2,5 \times 10^3$ /bunku, resp. 2×10^5 transformantov/ μg DNA (Tang et al., 1995; Shimogawara et al., 1998).

2.2.3 Transformácia pomocou sklenených guľičiek

Pri tejto metóde sa recipientné bunky vortexujú (pretrepávajú) v prítomnosti DNA, sklenených guľičiek a polyetylénglykolu (Kindle, 1990). Jednoduchosť a účinnosť tejto procedúry, rovnako ako fakt, že nevyžaduje žiadne špeciálne laboratórne vybavenie (na rozdiel od predchádzajúcich metód), robia túto metódu veľmi obľúbenou. Nevýhodou je však skutočnosť, že takto možno transformovať len bunky, ktoré nemajú bunkovú stenu (cw mutanty). Účinnosť tejto metódy je približne 10^3 transformantov/ μg DNA, resp. 10^{-4}

10^{-5} /bunku (Kindle, 1990). Aby bolo možné transformovať aj bunky s bunkovou stenou, sklenené guľičky sa nahradili silikónovými karbidovými vláknami a účinnosť transformácie bola 10^{-5} - 10^{-6} /bunku (Dunahay, 1993).

Kapitola 3

Ciele dizertačnej práce

Cieľom tejto dizertačnej práce bolo na základe molekulárnej, mutačnej a genetickej analýzy prispieť k rozšíreniu zbierky charakterizovaných mutantov *C. reinhardtii* ako základného predpokladu pre štúdium a pochopenie reparačných procesov fotoautotrofných organizmov. Pri analýze mutantov sme sa zamerali na nasledovné otázky:

- Štúdiom kriviek dávka-efekt a mutačnou analýzou sme sledovali fenotypový prejav reparačne-deficitných mutantov *C. reinhardtii* po pôsobení fyzikálnych a chemických agensov (ionizujúceho žiarenia a MNNG).
- Pomocou genetickej analýzy sme určovali, či sa jedná o mutácie v rôznych génoch (alelizmus mutantov).
- Pomocou molekulárnej analýzy sme sledovali excíziu pyrimidínových dimérov pri mutantoch zbierky.
- Zisťovali sme, či reparačno-deficitné kmene patria do skupiny, do ktorej boli predbežne zaradené.
- Zisťovali sme pravdepodobnú úlohu *UVS11* génu v regulácii bunkového cyklu a jeho vplyv na opravné procesy v bunke. V rámci tohto cieľa sme sa zamerali na:

1. Porovnanie reparačnej schopnosti mutantov *rad9* *S. cerevisiae* a *Uvs11* *C. reinhardtii* po pôsobení UV-, X-žiarenia a MMS bez zastavenia bunkového cyklu a po zastavení bunkového cyklu mikrotubulovým jedom metyl benzimidazol 2-yl- karbamátom (MBC).
 2. Determinovanie morfológie buniek mutantov *rad9* a *Uvs11* po pôsobení ionizujúceho žiarenia, bez ovplyvnenia MBC a po ovplyvnení MBC, pomocou optických a fluorescenčných mikroskopických metód.
 3. Sledovanie možnej analógie funkcie *RAD9* génu pri kvasinkách a *UVS11* génu pri riasach.
- Pokúsili sme sa uskutočniť úspešnú transformáciu jadrového genómu *C. reinhardtii*.

Kapitola 4

Materiál a metódy

4.1 Použité kmene

V experimentoch sme pracovali s nasledovnými kmeňmi:

- *Chlamydomonas reinhardtii*

Kmeň	Genotyp	Zdroj
<i>W1</i>	<i>137C mt⁺</i>	R. Matagne, University Liège, Belgicko
<i>uvs9</i>	<i>uvs9 mt⁺</i>	G.D. Small, Univ. of South Dakota, USA
<i>uvs10</i>	<i>uvs10 mt⁺</i>	Katedra genetiky, PriF UK Bratislava
<i>uvs11</i>	<i>uvs11mt⁺</i>	Katedra genetiky, PriF UK Bratislava
<i>uvs12</i>	<i>uvs12 mt⁺</i>	Katedra genetiky, PriF UK Bratislava
<i>uvs13</i>	<i>uvs13 mt⁺</i>	Katedra genetiky, PriF UK Bratislava
<i>uvs14</i>	<i>uvs14 mt⁺</i>	Katedra genetiky, PriF UK Bratislava
<i>uvs15</i>	<i>uvs15 mt⁺</i>	Katedra genetiky, PriF UK Bratislava
<i>uvsE1</i>	<i>uvsE1 mt⁻</i>	E. Harris, Duke University, USA
<i>uvs351</i>	<i>uvs351mt⁺</i>	Katedra genetiky, PriF UK Bratislava
<i>uvs371</i>	<i>uvs371mt⁺</i>	Katedra genetiky, PriF UK Bratislava
<i>uvs11arg7</i>	<i>uvs11 arg7-8 mt⁺</i>	Katedra genetiky, PriF UK Bratislava
<i>cw15:arg7</i>	<i>cw15 arg7-8 mt⁺</i>	J.D. Rochaix, Univ. of Geneva, Švajčiarsko
<i>cc51</i>	<i>arg7 mt⁻</i>	E. Harris, Duke University, USA
<i>cc620</i>	<i>wt mt⁺</i>	J.D. Rochaix, Univ. of Geneva, Švajčiarsko
<i>cc621</i>	<i>wt mt⁻</i>	J.D. Rochaix, Univ. of Geneva, Švajčiarsko

Tab. 4.1

- *Saccharomyces cerevisiae*

Kmeň	Genotyp	Zdroj
<i>Wt</i>	MATa leu2 trp1ura3 his2 lys1-1	
<i>rad9</i>	MATa leu2 trp1ura3 his2 lys1-1 <i>rad9::URA3</i>	Institut Curie, Paris, Prof. Fabre

Tab. 4.2

- *Escherichia coli*

Kmeň	Genotyp	Zdroj
<i>XLI-Blue</i>	RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacF' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)	J.D.Rochaix, Univ. of Geneva
<i>DH5-α</i>	F' end A1 hsdR17 recA1 supE44 thi-1λ- Δ(lacZYA-argF) U169φ 80lacZΔM15	J.D. Rochaix, Univ. of Geneva

Tab. 4.3

4.2 Kultivačné médiá

4.2.1 Médiá použité na kultiváciu rias

- TAP médium

Beijerinckov roztok pre TAP	50 ml
Tris–acetátový roztok	3,75 ml
Roztok fosforečnanov	25 ml
Stopové prvky	1 ml
Agar pre pevné médium	15 g
Doplniť vodou do 1000 ml	

Pri príprave bezdusíkatého TAP média (TAP-N) sme použili Beijerinckov roztok, v ktorom je NH₄Cl nahradené KCl v rovnakom množstve.

Pri kultivácii buniek deficitných v syntéze arginínu sme do TAP média pridali 40 μg arginínu na 1 ml pôdy.

- YA médium

Beijerinckov roztok I	50 ml
Roztok fosforečnanov	50 ml
Stopové prvky	1 ml
Acetát sodný	1,2 g
Kvasničný extrakt	4 g
Agar pre pevné médiá	15 g
Doplňte vodou do 1000 ml	

- HSA médium

Beijerinckov roztok I	50 ml
Roztok fosforečnanov	50 ml
Stopové prvky	1 ml
Acetát sodný	1,2 g
Agar pre pevné médiá	15 g
Doplňte vodou do 1000 ml	

- HSA1 médium

Beijerinckov roztok I	5 ml
Beijerinckov roztok II	45 ml
Roztok fosforečnanov	50 ml
Acetát sodný	1,2 g
Agar pre pevné médiá	15 g
Doplňte vodou do 1000 ml	

- HSA2 médium

Beijerinckov roztok II	10 ml
Roztok fosforečnanov	10 ml

Acetát sodný	0,24 g
Agar pre pevné médiá	15 g
Doplniť vodou do 1000 ml	

- HSZ médium

Beijerinckov roztok I	25 ml
Beijerinckov roztok II	25 ml
Roztok fosforečnanov	50 ml
Agar pre pevné médiá	40 g
Doplniť vodou do 1000 ml	

Médium sa sterilizuje 20 min pri 120 °C a tlaku 120 kPa. Po 24 hod sa sterilizuje druhýkrát a v prípade pevného média sa sterilne rozlieva do misiek.

Pri mutačnej analýze sme ako selektívne médium použili HSA médium s pridaním streptomycínu (100 µg/ml média).

Roztoky použité na prípravu médií:

- Beijerinckov roztok I (kompletný)

NH ₄ Cl	10 g rozpustiť v 450 ml H ₂ O
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,7 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,2 g rozpustiť v 450 ml H ₂ O
- Beijerinckov roztok II (bez dusíka)

z kompletného Beijerinckovho roztoku sa vynechá NH₄Cl
- Beijerinckov roztok pre TAP médium

NH ₄ Cl	8 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	1 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	2 g

doplniť do 1000 ml destilovanou vodou

- TRIS – acetátový zásobný roztok

Tris	48,4 g
ľadová kys. octová	20 ml

doplniť do 1000 ml destilovanou vodou

- Roztok fosforečnanov, pH 6,8

K ₂ HPO ₄	28,8 g
KH ₂ PO ₄	14,4 g
H ₂ O	1000 ml

doplniť do 1000 ml destilovanou vodou

- Stopové prvky (Hutner, 1950)

EDTA	50 g /250 ml H ₂ O
ZnSO ₄ .4 H ₂ O	22 g /100 ml H ₂ O
H ₃ BO ₃	11,4 g /200 ml H ₂ O
MnCl ₂ .4 H ₂ O	5,1 g / 50 ml H ₂ O
FeSO ₄ .7 H ₂ O	5,0 g / 50 ml H ₂ O
CoCl ₂ .6 H ₂ O	1,6 g / 50 ml H ₂ O
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,6 g / 50 ml H ₂ O
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4 H ₂ O	1,1 g / 50 ml H ₂ O

Príprava: Rozpustiť jednotlivé komponenty v príslušnom množstve vody. Všetky roztoky okrem EDTA zliať a povariť. Následne pridať EDTA, pričom celá zmes by mala nadobudnúť zelenú farbu. Ochladíť na 70 °C a pridaním 70 – 80 ml horúceho roztoku KOH (20 %) upraviť pH na 6,7. Roztok doplniť do konečného objemu 1 liter a nechať vo fľaši s vatovou zátkou na 1 – 2 týždne dozrieť. Po uplynutí tohto času sa zelená farba zmení na fialovú. V prípade, že sa vytvorí v roztoku usadenina, odstránime ju filtráciou cez 2 vrstvy Whatman I.

Poznámky: Kalibrácia pH metra pufrom sa robí tiež pri 70 °C.

Na úpravu pH nepoužívať NaOH.

Všetky roztoky sme uchovávali v chladničke pri 4 °C.

4.2.2 Médiá použité na kultiváciu kvasiniek *S. cerevisiae*

- YPD médium: kvasničný extrakt 10 g
Pepton 20 g
Glukóza (20 % roztok) 100 ml
Agar 20 g
Doplniť vodou do 1000 ml

4.2.3 Médiá použité na kultiváciu baktérií *E. coli*

- LB médium: kvasničný extrakt 5 g
Tryptón 10 g
NaCl 5 g
Agar 20 g
Doplniť vodou do 1000 ml

Do selekčných LB médií sme pridávali ampicilín v koncentrácii 0,1 mg/ml.

4.3 Použité mutagény

Ako zdroj UV žiarenia sme použili 30 W žiarivku TUV Phillips, ktorá emituje 97 % lúčov s vlnovou dĺžkou 253,7 nm. Intenzita žiarenia bola $5 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Ako chemický mutagén sme použili N-metyl-N'-nitro-N-nitrózoguanidín (MNNG) a metyl-metán-sulfonát (MMS).

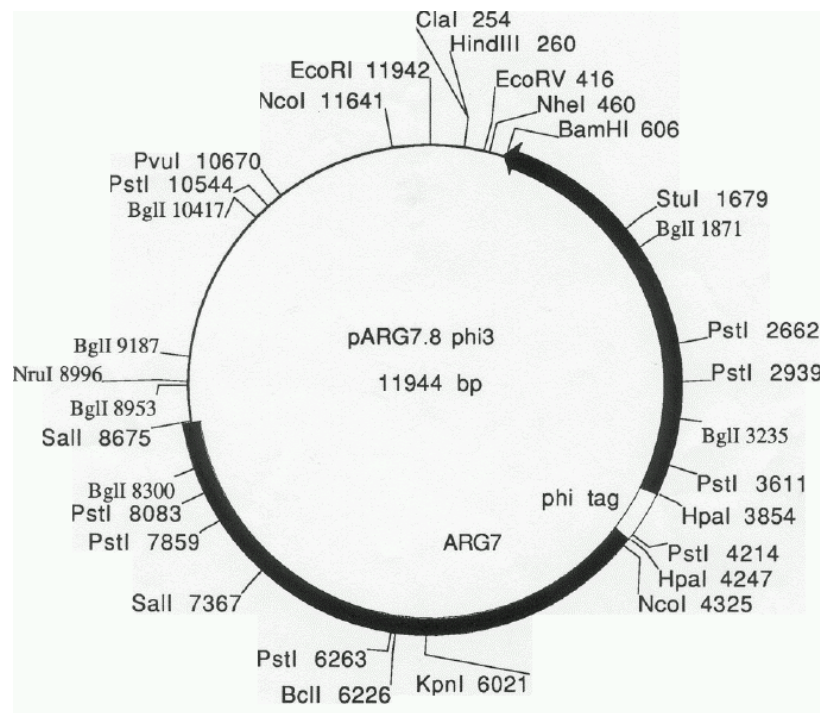
Ako zdroj X-žiarenia sme použili röntgenovu trubicu pracujúcu v režime 320kV a 10 mA s príkonom $18,06 \text{ krad} \cdot \text{h}^{-1}$.

4.4 Rádioaktívne značené chemikálie

[$2\text{-}^3\text{H}$] – adenín so špecifickou aktivitou 23 Ci/mmol (Amersham)

4.5 Plazmid použitý na transformáciu

Na transformáciu buniek *C. reinhardtii* sme použili plazmid pARG7-8 phi3 (11,944 kb) (Obr. 4.1) získaný z Oddelenia molekulárnej biológie, Univerzity v Ženeve (selekčný marker: rezistencia na ampicilín).



Obr. 4.1 Schéma plazmidu pARG7-8 phi3 použitého na transformáciu buniek *C. reinhardtii*. Plazmid skonštruoval Saul Purton.

4.6 Stanovenie prežívania a mutability reparačne-deficitných kmeňov *Chlamydomonas reinhardtii* po pôsobení UV-žiarenia, MMS a X-žiarenia

4.6.1 Príprava buniek na ovplyvňovanie mutagénmi

1. Príprava buniek začala prenesením buniek na HSA médium, na ktorom rástli 6 až 7 dní pri svetelnom režime 12 h svetlo /12 h tma.

2. Potom sme bunky naočkovali do tekutého HSA média, v ktorom sme ich nechali rásť 3 dni.
3. Rozrastenú kultúru sme scentrifugovali (5 min, 2500 ot./min, RT), rozsuspendovali v destilovanej vode. Bunky v kultúre sme spočítali pomocou Bürkerovej komôrky s použitím svetelného mikroskopu. Takto pripravenú kultúru sme ovplyvňovali mutagénmi.

4.6.2 Zastavenie bunkového cyklu *C. reinhardtii* pomocou MBC

4. Dvojdňovú kultúru sme na konci svetelnej periódy rozdelili na dve časti, scentrifugovali (5 min, 3000 ot./min, RT) a rozsuspendovali v rovnakom objeme HSA média.
5. Do jednej časti sme pridali MBC (zásobný roztok 30 mg/ml DMSO), tak aby výsledná koncentrácia MBC v médiu bola 300 µg/ml. Kultúry sme nechali rásť na svetelnej polici ďalších 12 hodín.
6. Bunky sme scentrifugovali (5 min, 3000 ot./min., RT), rozsuspendovali v príslušnom objeme vody a do kultúry, ktorá bola synchronizovaná a zablokovaná v G2 fáze pomocou MBC, sme opäť pridali MBC v pôvodnej koncentrácii.

4.6.3 Ovplyvnenie buniek *C. reinhardtii* mutagénmi

7. Pri sledovaní vplyvu UV žiarenia sme pripravenú kultúru rozdelili do 5 umelohmotných Petriho misiek po 3 ml a ovplyvňovali UV 254 nm dávkami 50, 100, 150 a 200 J.m⁻². Po ožiarení sme nechali bunky inkubovať 1 hodinu s MBC v tme, aby sme zabránili fotoreaktivácii.
8. Pri sledovaní vplyvu MMS sme pripravenú kultúru rozdelili do 5 skúmaviek po 2 ml a pridávali sme MMS (10% zásobný roztok) do výslednej koncentrácie 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4 %. Kultúry sme ovplyvňovali 1 hodinu v tme na trepačke. Po ukončení ovplyvňovania sme kultúru scentrifugovali a premytím zbavili zvyškov mutagénu.

9. Pri sledovaní vplyvu MNNG sme pripravenú kultúru rozdelili do 4 skúmaviek po 2 ml. Použili sme tri koncentrácie MNNG (zásobný roztok 4 mg MNNG v 1 ml 5% DMSO) – 50, 100 a 200 $\mu\text{g/ml}$ a jednu kontrolu (5% DMSO bez MNNG). Kultúry sme ovplyvňovali 30 minút v tme na trepačke. Po ukončení ovplyvňovania sme kultúru scentrifugovali a premytím zbavili zvyškov mutagénu.
10. Pri sledovaní vplyvu X-žiarenia sme pripravenú kultúru rozdelili do 3 umelohmotných skúmaviek a ovplyvňovali dávkami 4,5 a 9 krad.
11. Po ukončení ovplyvňovania sme bunky scentrifugovali, premyli v destilovanej vode, aby sme odstránili MBC, nariedili na potrebnú hustotu (75 000 – 100 000 buniek na pevné HSA médium pri hodnotení prežívania a $3\text{-}9 \times 10^6$ buniek na pevné HSA médium so streptomycínom pri hodnotení mutability) a vysievali na pevné HSA médium.
12. Petriho misky sme kultivovali 5 až 7 dní (stanovenie prežívania), resp. 21 dní (stanovenie mutability) na svetelnej polici.

4.6.4 Stanovenie prežívania

13. Prežívanie buniek sme hodnotili mikroskopicky. Osobitne sme hodnotili odumieranie buniek pred a po rozdelení. Pri každom pokuse a každom variante sme hodnotili aspoň 2 Petriho misky, na každej aspoň 250 kolónií. Každý experiment sme opakovali minimálne trikrát.

4.6.5 Stanovenie mutability

14. Petriho misky sme kultivovali 3 týždne na svetelnej polici. Po troch týždňoch sme robili vizuálne hodnotenie spočítaním vyrastených kolónií na platniach so streptomycínom.

4.7 Stanovenie prežívania buniek *S. cerevisiae* po pôsobení UV-žiarenia, MMS a X-žiarenia

4.7.1 Príprava buniek na ovplyvňovanie mutagénmi

1. Bunky sme naočkovali do 100 ml tekutého YPD média a nechali rásť až do dosiahnutia exponenciálnej fázy (18-20 hodín). V exponenciálnej fáze rastu malo 90 % všetkých kvasinkových buniek pri mikroskopickom hodnotení typický činkovitý tvar pozostávajúci z dvoch nerozdelených, rovnako veľkých buniek.
2. Bunky sme scentrifugovali (5 min, 3500 ot./min, RT) a rozsuspenovali v YPD médiu.
3. Kultúry sme rozdelili na dve časti (po 50 ml), do jednej sme pridali MBC (zásobný roztok 10 mg/ml) tak, aby výsledná koncentrácia bola 1 %. Takto pripravenú kultúru sme kultivovali 3 hodiny na trepačke (Weinert a Hartwell, 1990).
4. Kultúry sme scentrifugovali, premyli vodou a spočítali. Pre ovplyvňovanie buniek MMS sme kultúry rozsuspendovali v 10 ml fosfátového pufru, ktorý udržiava optimálne pH po aplikácii MMS. Kultúry ovplyvňované UV- a X-žiarením sme rozsuspendovali v sterilnej vode. Do predovplyvnených kultúr sme opäť pridali MBC v rovnakej koncentrácii.

4.7.2 Ovplyvnenie buniek *S. cerevisiae* mutagénmi

5. Pri sledovaní vplyvu UV žiarenia sme pripravenú kultúru rozdelili do 4 umelohmotných Petriho misiek po 3 ml a ovplyvňovali UV 254 nm dávkami 50, 100 a 150 J.m⁻². Po ožiarení sme nechali bunky inkubovať 1 hodinu s MBC v tme, aby sme zabránili fotoreaktivácii.
6. Pri sledovaní vplyvu MMS sme pripravenú kultúru rozdelili do 5 skúmaviek po 2 ml a pridávali sme MMS (10% zásobný roztok) do výslednej koncentrácie 0,05; 0,1; 0,2 a 0,3 %. Vzorky sme ovplyvňovali 1 hodinu na trepačke. Po ukončení ovplyvňovania sme kultúru scentrifugovali a premytím zbavili zvyškov mutagénu.

7. Pri sledovaní vplyvu X-žiarenia sme pripravenú kultúru rozdelili do 3 umelohmotných skúmaviek a ovplyvňovali dávkami 4,5 a 9 krad.
8. Po skončení ovplyvňovania sme bunky scentrifugovali (5 min, 3500ot./min, RT), premytím v sterilnej destilovanej vode odstránili MBC, nariedili na potrebnú hustotu a vysievali.
9. Petriho misky sme kultivovali 3 dni pri 29 °C.
10. Počet narastených kolónií sme hodnotili pomocou laserového počítača Artek – Counter M880.

4.8 Genetická analýza *C. reinhardtii*

4.8.1 Rekombinačná analýza

1. Príprava buniek pre kríženie začala prenesením buniek na YA médium, na ktorom rástli 6 až 7 dní. Potom sme bunky preniesli na HSA pôdu s 1/10 obsahom dusíka v porovnaní so štandardnou pôdou, na ktorej bunky rástli 48 hodín.
2. Po dvoch dňoch kultivácie na HAS s 1/10 obsahom dusíka sme bunky preniesli do Erlenmayerových baniek s tekutou pôdou bez dusíka, ktorá bola päťkrát zriedená. V tejto pôde sme ponechali bunky 5 hodín. Potom sme preverili kríženie kmeňov zmiešaním vzoriek opozitných pohlavných typov na podložnom sklíčku. Ak sa nekrížili, kultivovali sme bunky v tejto pôde ďalšie 2 až 3 hodiny.
3. Ak sa bunky krížili, zmiešali sme odpovedajúce množstvá opozitných pohlavných typov a ponechali v skúmavke na svetelnej polici 0,5 až 1 hodinu. Potom sme 0,5 ml krížiacich sa buniek vysievali na HS pôdu so 4% agarom a polovičným obsahom dusíka a kultivovali na svetle približne 20 hodín (nie však viac ako 24). Potom sme misky zabalili do alobalu a kultivovali v tme 6 až 7 dní.
4. Po ukončení kultivácie v tme sme zygoty preniesli a rozťahli na YA médium a kultivovali 16 až 20 hodín, aby prebehla meióza.

5. Pri prenose zygót mohlo dôjsť aj k prenosu vegetatívnych buniek, preto sme platňu s rozťahnutými zygotami vystavili na 30 sec účinkom pár chloroformu, ktorý inaktivuje vegetatívne bunky.
6. Haploidné produkty žvotaschopných zygót sme potom sklenou ihlou rozťahovali pozdĺž vopred žiletkou vyznačených zvislých čiar na vzdialenosť zorného poľa lupy.
7. Vyrastené kolónie sme preniesli do replikátora. Pripravili sme tak suspenzie jednotlivých kolónií, ktoré sme preniesli na 4 YA platne. Jednu sme použili ako kontrolný variant a ostatné sme ožiarili dávkami 25, 50 a 100 J.m⁻² UV žiarenia. UV citlosť sme hodnotili vizuálne porovnaním ožiarených variantov s neožiarenými variantami s neožiarenou kontrolou.

4.8.2 Analýza na úrovni zygót

1. až 5. bod sú rovnaké ako pri rekombinačnej analýze.
6. Zygoty sme nechali rozrásť a z vyrastených kolónií sme pripravili suspenziu buniek, ktorú sme potom vysievali na YA platne v podobe čiar.
7. Polovicu YA platne s vysiatými bunkami sme zakryli kovovou doštičkou (slúžila ako kontrola) a druhú polovicu sme ovplyvnili UV žiarením dávkami 20 až 30 sec. Vyštiepovanie štandardného typu sme opäť hodnotili vizuálnym porovnaním s neožiarenou kontrolou.

4.9 Stanovenie excízie pyrimidínových dimérov po pôsobení UV žiarenia

Vyštiepovanie pyrimidínových dimérov sme stanovili podľa Smalla a Greimannovej (1977). Na monitorovanie prítomnosti pyrimidínových dimérov sme použili UV špecifickú endonukleázu, ktorá štiepi DNA v miestach pyrimidínových dimérov.

Príprava kmeňov:

1. Do 12 ml tekutého TAP média sme naočkovali bunky *C. reinhardtii* s koncentráciou $5 \cdot 10^5$ buniek/ml média.
2. Do kultúry sme pridali rádioaktívne značený adenín tak, aby výsledná koncentrácia bola 3 mCi /ml.
3. Kultúru sme kultivovali dva dni na trepačkách na svetelnej polici do výslednej koncentrácie minimálne $1 \cdot 10^6$ buniek/ml média.

1.deň

Ožiarenie buniek:

4. Dvojdňovú kultúru sme ovplyvnili UV žiarením dávkou $50 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$ v Petriho miske s priemerom 15 cm.
5. Polovicu kultúry (6 ml) sme hneď po ožiarení preniesli do Erlenmayerovej banky a inkubovali 24 hodín na trepačke v tme (aby sme zabránili fotoaktivácii). Po 24 hodinách sme s týmito vzorkami pokračovali v postupe od bodu č. 6.

Extrakcia DNA:

6. Druhú polovicu kultúry (6 ml) sme scentrifugovali (15 min, 3700 ot./min, RT) a premyli 5 ml $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ EDTA, pH 8,0.
7. Po premytí sme vzorky preniesli do sterilných mikrocenrifugačných (Eppendorfových) skúmaviek pridaním $0,4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris-HCl-1% SDS - $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl, pH 9,0.
8. Vzorky sme nechali stáť 25 minút pri izbovej teplote.
9. Extrakciu DNA sme urobili pridaním 0,4 ml zmesi fenol:chloroform:izoamylalkohol v pomere 25:24:1 (podľa Molecular cloning: A laboratory manual, Sambrook et al., 1989) a obsah skúmaviek sme opatrne premiešali.
10. Zmes sme centrifugovali (3 min, 1600 ot./min, RT).
11. Vrchnú vodnú fázu sme preniesli automatickou pipetou so zastrihnutou špičkou (aby sme zabránili mechanickému poškodeniu DNA) do čistej Eppendorfovej skúmavky.
12. Zopakovali sme fenolovú extrakciu podľa bodov 9-10.
13. K získanej vodnej fáze sme pridali rovnaký objem chloroformu a vzorku sme opäť centrifugovali (3 min, 1600 ot./min, RT).

14. Vrchnú fázu s extrahovanou DNA sme opatrne preniesli do vopred pripravených dialyzačných hadičiek (pozri Príprava dialyzačných hadičiek) a nechali na miešačke dialyzovať cez noc v 1 litri roztoku $0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$ TrisHCl - $0,1 \text{ nmol.dm}^{-3}$ EDTA, pH 7,5 v chladiacom boxe.

2.deň

Štiepenie izolovanej DNA UV špecifickou endonukleázou:

15. Z každej vzorky po dialýze sme pripravili dva varianty:

I. DNA bez UV endonukleázy

II. DNA 1 + 10 ml UV endonukleázy.

16. Do každého variantu sme pridali 50 ml $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ NaCl.

17. Vzorky sme nechali inkubovať 30 min. na vodnom kúpeli s teplotou $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Centrifugácia DNA v sacharózovom gradiente:

18. Na pripravený sacharózový gradient (pozri príprava sacharózového gradientu) sme naniesli $100 \mu\text{l}$ 1 mol.dm^{-3} NaOH a $110 \mu\text{l}$ inkubovanej zmesi. Vzorky sme pri nanášaní nechali stekať po stene centrifugačnej skúmavky.

19. Nanesené objemy sme opatrne premiešali špendlíkom a nechali stáť 10 minút pri izbovej teplote.

20. Vzorky sme centrifugovali 150 minút pri 30000 ot./min pri teplote 20°C . Po skončení centrifúgácie sme na zastavenie rotora použili brzdu.

Rozkvapkanie gradientov a hydrolyza RNA:

21. Po centrifugácii sme jednotlivé gradienty rozkvapkali v intervaloch 10 sec. do Eppendorfových skúmaviek (z každého gradientu sme získali približne 20 frakcií).

22. Do každej frakcie pridali $0,4 \text{ ml}$ 1 mol.dm^{-3} NaOH.

23. Skúmavky s jednotlivými frakciami sme nechali inkubovať cez noc na vodnom kúpeli s teplotou $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, aby prebehla hydrolyza RNA.

3.deň

Zastavenie hydrolýzy a filtrácia:

24. Do skúmaviek s jednotlivými frakciami sme pridali 50 μ l calf-thymus DNA (2mg/ml).
25. Hydrolýzu sme zastavili pridaním rovnakého objemu 20% TCA (0,8 ml).
26. Vzorky sme prefiltrovali cez filtre (glass fiber filter, priemer 2,4 cm, Whatman), premyté v roztoku adenínu (50 μ g/ml).

Premývanie filtrov a meranie rádioaktivity:

28. Po filtrácii sme filtre premývali dvakrát 10 min v studenej 10% TCA, jedenkrát 10 min v 80% etanole a jedenkrát 10 min v acetóne.
29. Vysušené filtre sme vkladali do scintilačných flaštičiek s 5 ml toluénovej scintilačnej tekutiny (SLT).
30. Aktivitu vzoriek sme merali na scintilačnom prístroji Beckman na Ústave molekulárnej biológie SAV.

Zloženie toluénovej scintilačnej tekutiny (SLT):

PPO	5 g
POPOP	67 mg
toluén	1000 ml

Príprava dialyzačných hadičiek:

1. Hadičky sme nastrihali do vhodnej dĺžky (asi 10 cm).
2. Nastrihané hadičky sme varili 10 min vo veľkom objeme 2% NaHCO_3 1 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ EDTA.
3. Hadičky sme prepláchli v destilovanej vode a opäť varili 10 min v destilovanej vode.
4. Hadičky sme nechali vychladnúť a uchovávali pri 5 °C ponorené v destilovanej vode.
5. Pred použitím sme hadičky prepláchli destilovanou vodou. Vždy sme pracovali v rukaviciach.

Príprava sacharózového gradientu:

Na prípravu sacharózového gradientu sme pripravili nasledovné roztoky:

- A) 25 ml 10% sacharózy
- B) 25 ml 40% sacharózy
- C) 50 ml 1 mol.dm⁻³ EDTA - 0,4 mol.dm⁻³ NaOH.

Zmiešali sme 25 ml roztoku A s 25 ml roztoku C a 25 ml roztoku B s 25 ml roztoku C. Získali sme tak 5% a 20% roztok sacharózy.

Jeden gradient obsahoval 4,8 ml. My sme pripravovali 3 gradienty súčasne. Na prípravu 3 gradientov sme napipetovali 7,2 ml 20% a 7,2 ml 5% roztoku sacharózy do zmiešavacej komôrky. V komôrke s 20% sacharózou sme pustili miešadlo a otvorili prietok medzi komôrkami s 20% a 5% sacharózou. Pri plnení skúmaviek sacharóza stekala po stenách, aby sa vytvoril gradient.

*Izolácia UV endonukleázy z buniek *M. luteus*:*

Enzým UV endonukleázu z baktérií *Micrococcus luteus* sme izolovali modifikovanou metódou podľa Carrieria a Setlowa (1970).

1. 3 g sušených buniek *M. luteus* ATCC 4698 (Miles Laboratories, Inc., U.S.A.) sme rozsuspendovali v 100 ml 10 mM Tris.Cl, pH 8.0, rozotrelí v homogenizátore a centrifugovali v Beckman centrifúge (6000 ot./min., 15 min., 15°C). Supernatant sme zliali a sedimentované bunky resuspendovali v 150 ml roztoku 0,2 M sacharóza, 10 mM Tris.Cl, pH 8.0. Po pridaní 20 mg lyzozýmu sa bunky inkubovali 30 min. pri 30°C a prudko schladili pridaním 125 ml sterilnej studenej vody za intenzívneho miešania - frakcia I. Od tohto kroku sa už všetky nasledujúce operácie uskutočňovali v ľadovom kúpeli, resp. pri 0°C.
2. K frakcii I sme pridali v priebehu 30 minút za stáleho miešania 30 ml 10% streptomycín sulfátu a nechali miešať ďalších 30 minút. Po centrifugácii (8000 ot./min., 4°C, 30min.) sme zachytili supernatant - frakcia II.
3. Z frakcie II sa bielkoviny zrážali cez noc v chladnom boxe za stáleho miešania pevným síranom amónnym do 65 % nasýtenia (128,7g). Precipitát sa odcentrifugoval

- (14000 ot./min., 4°C, 40 min.) a sediment sme resuspendovali v 25 ml roztoku 10 mM TrisCl, pH 7.5, 1 mM β -merkaptetoetanol, 5 % etylénglykol - frakcia III.
4. K frakcii III sme pridali 125 ml roztoku 10 mM Tris.Cl, pH 7.5, 1mM β - merkaptetoetanol, 5% etylénglykol. Celý objem, t.j. 150 ml, sme naniesli na DEAE kolónu (vid' Príprava DEAE kolóny) v chladnom boxe. Roztok 10 mM Tris.Cl, pH 7.5, 0,001 mM β - merkaptetoetanol (600 ml) sme použili ako premývací pufor počas chromatografického delenia vzorky na kolóne.
 5. Po nanesení vzorky na kolónu sme zapli zberač frakcií (10 ml frakcie, 15 min.). Prítomnosť bielkovín v jednotlivých frakciách sme zisťovali farbením podľa Bradforda. Najintenzívnejšie sfarbené frakcie sme vysolili s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 80 % nasýtenia (t.j. 561 g pevného síranu amónneho na 1000 ml) a nechali miešať cez noc pri 4 °C.
 6. Na druhý deň sme po centrifugácii (8000 ot./min., 4 °C, 30 min.) sediment resuspendovali v 1 ml pufru 50 mM Tris.Cl, pH 7.5, 1 mM β - merkaptetoetanol, 10 % etylénglykol. Takto izolovanú UV endonukleázu sme uchovávali pri teplote - 20°C.

Na základe testovania aktivity endonukleázy sme určili optimálnu dávku 10 μ l na jednu vzorku.

Príprava DEAE kolóny:

Na prípravu DEAE kolóny sme použili cca 40 cm dlhú sklenenú kolónu s priemerom 1,8 cm. Do jej spodnej časti sme dali kúsky silikonizovanej sklenej vaty. Náplň kolóny tvorila DEAE celulóza 32 (WHATMAN), ktorú sme najskôr rozpustili v 15-násobnom objeme 0,5 N HCl, nechali miešať 30 minút pri laboratórnej teplote a potom premývali H_2O , kým pH filtrátu bolo cca 4,0. K DEAE celulóze sme potom pridali 15-násobný objem 0,5 N NaOH, nechali miešať 30 minút, prefiltrovali a ešte raz zopakovali s 0,5 N NaOH. Po prefiltrovaní sme celulózu premývali s roztokom 10 mM TrisCl, pH 7,5, kým nemal filtrát približne neutrálne pH. Na takto pripravenú DEAE kolónu sme naniesli nami vyizolovanú vzorku.

4.10 Fluorescenčná mikroskopia

Metódu fluorescenčnej mikroskopie sme využili pri pozorovaní účinku mikrotubulového destabilizátora MBC na zablokovanie bunkového cyklu pri riase *C. reinhardtii*.

1. Z exponenciálne rastúcej kultúry buniek (OD = 0,2 – 1,5) sme odobrali 1,5 ml vzorky do eppendorfových skúmaviek a scentrifugovali ich (5 min, 4 500 g, RT). Po odsatí supernatantu sme bunkový sediment fixovali pridaním zmesi formaldehyd : metanol (1:1), pri teplote -20°C na 20 min., čím zároveň došlo k odfarbeniu chlorofylu (spôsobuje primárnu fluorescenciu).
2. Suspenziu sme centrifugovali a dvakrát premyli, sediment sme nechali zmraziť cez noc. Ráno sme pridali 2% SDS na 15 min a následne dvakrát premyli vodou.
3. Pridali sme 10 µl DAPI (1 µg/ml st. H₂O) a nechali pôsobiť 30 min pri RT. Pripravené preparáty sme hneď pozorovali fluorescenčným mikroskopom.
4. Ak bunky neboli dostatočne zafarbené, nechali sme DAPI pôsobiť cez noc pri 4°C alebo sme použili vyššiu koncentráciu (1,5 – 2 µg DAPI / ml st. H₂O).

4.11 Transformácia buniek *C. reinhardtii*

4.11.1 Izolácia plazmidovej DNA z *E. coli*

(modifikovaná podľa Sambrook et al. (1989))

Baktérie sme naočkovali do 100 ml LB média s ampicilínom a kultivovali cez noc pri 37°C na trepačke. Bunky sa sedimentujú centrifugáciou (3 min, 12 000 g, 4 °C). Sediment sa premyje s 0,5 ml čerstvého alkalického roztoku SDS (1%), po premiešaní sa nechá stáť na ľade minimálne 5 minút. Po inkubácii sa pridá 2,55 ml K-acetátu, opäť dobre premieša a položí na ľad na 3 - 5 minút.

Po centrifugácii (5 minút, 12 000 g, 4 °C) sa získa supernatant, ktorý preniesieme do novej centrifugačnej skúmavky. Tu sa pridá zmes fenol:chloroform: izoamylalkohol

(25:24:1) v pomere 1:1 a zmes premiešame, potom centrifugujeme (3 min, 12 000 g, 25° C). Vrchná vrstva sa precipituje s etanolom v pomere 1:2, po premiešaní sa inkubuje 5 minút na ľade (-20 °C).

Precipitát sa centrifuguje (10 minút, 12 000 g, 4 °C), sediment sa premyje 70 % etanolom a nechá usušiť. Získaný preparát pDNA sa pred ďalším použitím rozriedi so sterilnou H₂O (2 µg/20 µl H₂O).

4.11.2 Štiepenie plazmidovej DNA reštrikčnou endonukleázou NcoI

Štiepenie prebieha v celkovom objeme 10 µl : 1 µl pDNA (1 µl tlmivého roztoku, 1 µl reštrikčnej endonukleázy NcoI a sterilnou vodou sa doplní na výsledný objem 10 µl). Reakčná zmes sa inkubuje 1 h pri 37° C. Štiepenie zastavíme pridaním 1 µl STOP roztoku. Takto pripravené vzorky sa následne nanesú na gél.

4.11.3 Elektroforéza DNA

Na elektroforézu sme použili 1 % agarózový gél v elektródovom tlmivom roztoku TE. Gél obsahoval etídium bromid v koncentrácii 0,5 µg/ml. Pripravené vzorky sa naniesli automatickou pipetou do jamiek gélu.

Elektroforéza prebiehala 3 h pri 60 V. DNA sa v géli vizualizuje pod UV svetlom a zaznamenáva fotografickým prístrojom.

4.11.4 Izolácia autolyzínu

(modifikované podľa Buchanana a Shella, 1988)

Kmene CC620 /mt⁺/ a CC621 /mt⁻/ sme naočkovali do 200 ml tekutého média TAP a kultivovali na svetle 3 dni (do hustoty 5 - 7 x 10⁶ buniek/ml). Po kultivácii sme obe kultúry scentrifugovali (5 minút, 2500 ot./min, 25 °C) a získané sedimenty sme rozsuspendovali v 75 ml tekutej TAP bez dusíka a kultivovali cez noc na trepačkách na svetelnej polici.

Bunky sme zráтали v Bürkerovej komôrke a centrifugovali /5 minút, 2500 ot./min, 25 °C/. Oba kmene sme osobitne rozsuspendovali v 10 mM roztoku Hepes, 1 mM CaCl₂ (pH 7,2), aby ich výsledná hustota bola 3 x 10⁸ buniek/ml. Zmiešali sme rovnaké množstvá (50 ml) CC620 a CC621 v Erlenmayerovej banke a nechali stáť na svetelnej polici 30 min. Po uplynutí tejto doby sme skontrolovali priebeh kríženia pod mikroskopom. Ak sa bunky nekrížili, nechali sme ich na svetelnej polici ďalších 30 min. Ak sa bunky krížili, kultúru sme scentrifugovali (5 minút, 2500 ot./min, 4° C/, získaný supernatant preniesli do čistej centrifugačnej skúmavky a centrifugovali /30 minút, 15 000 ot./min, 4° C/. Získaný supernatant, ktorý obsahoval autolyzín, sme prefiltrovali cez glass-fiber filter (priemer pórov 0,45 µm).

Takto izolovaný autolyzín sme preniesli do sterilných mikrocentrifugačných skúmaviek a uskladnili pri – 20 °C. Autolyzín môže byť rozmrazený viac ako jeden-krát a stále si zachová svoju aktivitu.

Testovanie autolyzínu:

Do dvoch pripravených mikrocentrifugačných skúmaviek napipetujeme

1. 10 µl buniek z kultúry ovplyvnenej autolyzínom
 - + 40 µl dest. H₂O
 - + 50 µl 1 % Triton X-100
2. 10 µl buniek z kultúry ovplyvnenej autolyzínom
 - + 40 µl dest. H₂O
 - + 50 µl dest. H₂O

Ak je autolyzín účinný, TritonX spôsobí lýzu buniek v skúmavke 1., čo môžeme pozorovať pomocou mikroskopu. V skúmavke 2. pozorujeme okrúhle bunky zbavené bunkovej steny.

4.11.5 Odstránenie bunkovej steny *C. reinhardtii* pomocou autolyzínu

1. Bunky sme nechali rásť v tekutom TAP médiu na svetelnej polici 3-4 dni.
2. Po spočítaní buniek pomocou Bürkerovej komôrky sme kultúru scentrifugovali (5 min, 3000 ot./min, RT). Sediment sme rozsuspendovali v malom objeme TAP média tak, aby po pridaní autolyzínu bola výsledná koncentrácia $2 \cdot 10^7$ buniek/ml.
3. Pridali sme autolyzín (1 ml na $8 \cdot 10^7$ buniek) a inkubovali minimálne 1 hodinu na trepačke.
4. Po inkubácii sme mikroskopicky pozorovali odstránenie bunkovej steny. Ak došlo k odstráneniu bunkovej steny, bunky zmenili tvar z vajcovitého na guľovitý.
5. K suspenzii sme pridali tekuté TAP médium, scentrifugovali a rozsuspendovali opäť v TAP médiu do želanej koncentrácie potrebnej pre transformáciu.

4.11.6 Transformácia buniek *C. reinhardtii*

1. Narastenú kultúru buniek ($2 \cdot 10^6$ buniek/ml) sme scentrifugovali (5 min, 3000 ot./min, RT). Supernatant sme odstránili a sediment premyli sterilnou vodou.
2. Pred transformáciou buniek s neporušenou bunkovou stenou sme najskôr odstránili bunkovú stenu podľa postupu 4.12.5.
3. Po odstránení bunkovej steny sme bunky rozsuspendovali v TAP médiu do výslednej koncentrácie 10^8 buniek/ml.
4. Do vopred pripravených sterilných skúmaviek obsahujúcich sklenené guľičky (0,33 g/skúmavka) sme napipetovali 100 μ l 20% PEG 8000.
5. Do skúmavky sme ďalej pridali 300 μ l kultúry a 10 μ l DNA (1 μ g/10 μ l).
6. Následne sme každú skúmavku vortexovali 15 sekúnd a hneď pridali 400 μ l Tap média. Po jemnom premiešaní sme obsah skúmavky rovnomerne vyliali na pripravené Petriho misky.
7. Petriho misky sme potom prikryli alobalom a nechali vysušiť. Po vysušení sme misky preniesli na svetelnú policu a kultivovali 1-3 týždne.

Kapitola 5

Výsledky

5.1 Letálny a mutagénny účinok MNNG a X-žiarenia na reparačne-deficitné kmene *C. reinhardtii*

5.1.1 Prežívanie po pôsobení MNNG a X-žiarenia

Základnú charakteristiku o citlivosti reparačne deficitných mutantov získame porovnaním ich kriviek prežívania s prežívaním buniek štandardného typu. Prežívanie buniek závisí od ich citlivosti k danému agensu a percento prežívania sa stanovuje na základe počtu vyrastených kolónií z celkového počtu hodnotených buniek.

V grafoch a tabuľkách sú uvedené priemerné hodnoty prepočítané na 100 % kontrolu získané z viacerých pokusov (minimálne tri pre každý kmeň). V každom pokuse a pri každej dávke sme hodnotili dve Petriho misky, na každej minimálne 250 kolónií. Samostatne sme hodnotili odumieranie buniek pred a po delení. Výsledky hodnotenia účinku MNNG na prežívanie buniek štandardného kmeňa a reparačne-deficitných mutantov sú znázornené v grafoch 5.1 a 5.2 a v tabuľke 5.1.

Z porovnania prežívania mutantov a štandardného kmeňa po pôsobení MNNG vyplýva, že všetky testované kmene sú citlivejšie ako štandardný kmeň. Najcitlivejšími spomedzi testovaných kmeňov boli mutantné kmene *uvsE1* a *uvs15*.

Výsledky hodnotenia účinku X-žiarenia na prežívanie buniek štandardného kmeňa a reparačne-deficitných mutantov sú znázornené v grafoch 5.3 a 5.4 a v tabuľke 5.2.

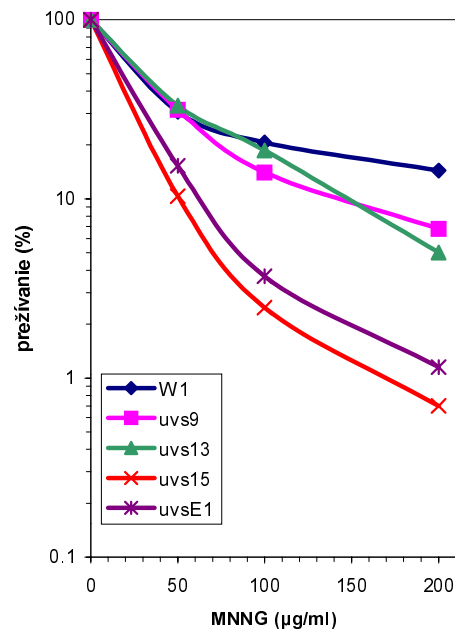
V prípade ovplyvnenia X-žiarením je väčšina mutantných kmeňov citlivejšia ako štandardný typ. Výnimku tvorí iba kmeň *uvs12* s poruchou excíznej reparačnej dráhy. Najcitlivejším spomedzi testovaných kmeňov bol, podobne ako v prípade MNNG, kmeň *uvs15* s doteraz presne nedefinovanou poruchou reparačného mechanizmu. Kmeň *uvsE1*, s poruchou rekombinačného reparačného mechanizmu, tiež veľmi citlivo reagoval na ovplyvnenie X-žiarením.

Výsledky analýzy odumierania buniek pred a po rozdelení sú uvedené v tabuľkách 5.1 a 5.2. Analýzu sme robili na základe mikroskopického hodnotenia odumierania buniek. Morfológický obraz hynutia buniek pred (jedna odumretá bunka) a po (mikrokolónia mŕtvych buniek) rozdelení vyjadruje schopnosť bunky vysporiadať sa s poškodením DNA po pôsobení mutagénu. Umožňuje tiež rozlíšiť príčiny odumierania buniek. Odumieranie buniek pred delením môže byť spôsobené cytotoxickým pôsobením použitého mutagénu, zatiaľčo odumieranie po rozdelení je prevažnou mierou zapríčinené poškodením genetického materiálu bunky.

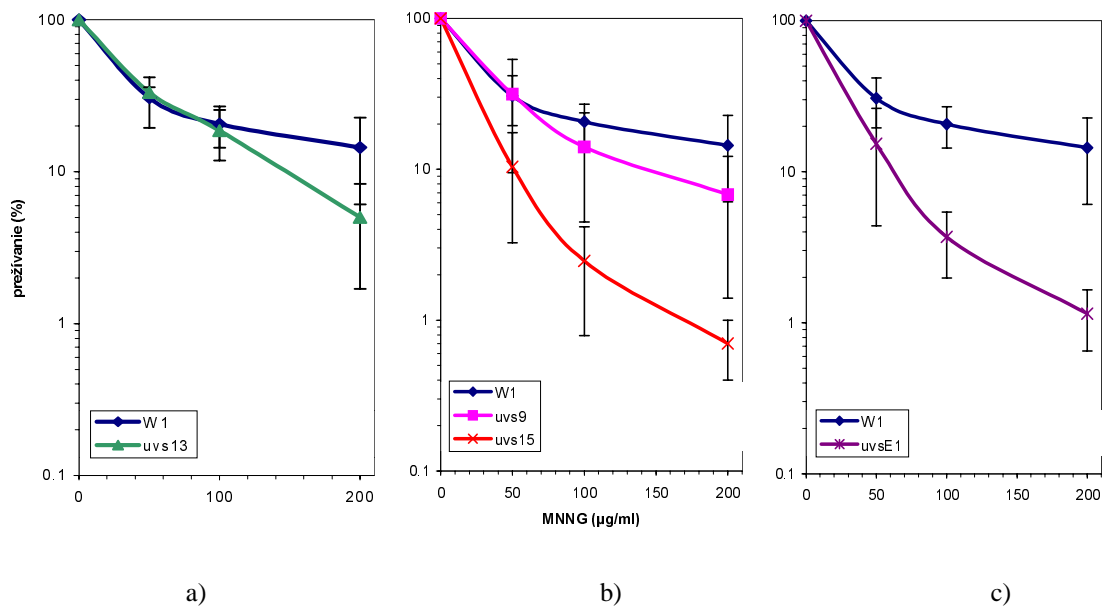
Z uvedených výsledkov vyplýva, že pomerné zastúpenie odumierania pred a po rozdelení v závislosti na dávke MNNG má podobný priebeh pri štandardnom kmeni i UV-citlivých mutantov, pričom pri všetkých kmeňoch odumiera väčšia časť buniek pred rozdelením, pravdepodobne vplyvom cytotoxického účinku MNNG (Tab. 5.1). Inak je tomu v prípade X-žiarenia (Tab. 5.2), kedy pri rekombinačne-deficitných mutantoch *uvsE1* a *uvs10* a mutantoch *uvs13* a *uvs14*, s doteraz nedefinovanou poruchou reparačného mechanizmu, stúpa v porovnaní s kontrolou zastúpenie buniek odumretých po delení. Výnimku tvoria kmene s poruchou excízneho mechanizmu *uvs12* a *uvs15*, pri ktorých odumiera väčšia časť buniek pred rozdelením, podobne ako pri štandardnom kmeni.

Kmeň	Koncentrácia MNNG ($\mu\text{g/ml}$)	Prežívanie	Zastúpenie buniek odumretých pred delením zo všetkých odumretých buniek	Zastúpenie buniek odumretých po delení zo všetkých odumretých buniek
WI	K	100	83,82	16,18
	50	30,67	64,98	35,02
	100	20,65	67,40	32,6
	200	14,42	80,19	19,81
uvs9	K	100	81,45	18,55
	50	31,47	62,67	37,33
	100	14,07	64,08	35,92
	200	6,8	75,04	24,96
uvs13	K	100	85,62	14,38
	50	33,23	58,56	41,44
	100	18,66	68,27	31,73
	200	5,019	81,88	18,12
uvs15	K	100	71,15	28,85
	50	10,38	58,89	41,11
	100	2,47	69,85	30,15
	200	0,7	75,66	24,34
uvsE1	K	100	83,08	16,92
	50	15,3	63,71	36,29
	100	3,7	70,78	29,22
	200	1,15	80,34	19,66

Tab. 5.1 Prežívanie štandardného kmeňa *WI* a reparačne-deficitných mutantov *C. reinhardtii* po pôsobení MNNG prepočítané na 100 % kontrolu. Výsledky analýzy odumierania buniek pred a po delení.



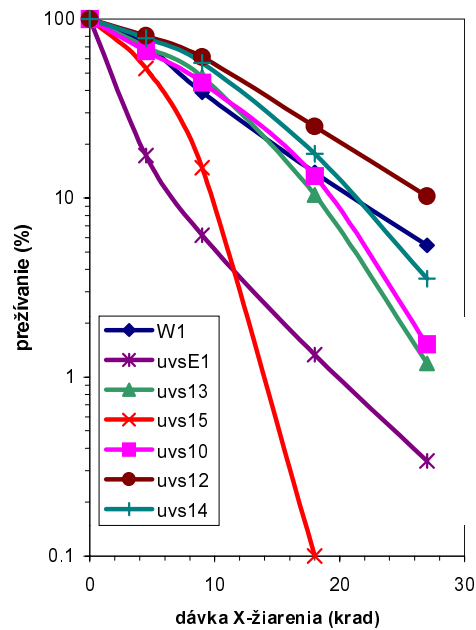
Obr. 5.1 Prežívania štandardného kmeňa W1 a reparačne-deficitných mutantov *C. reinhardtii* po pôsobení MNNG.



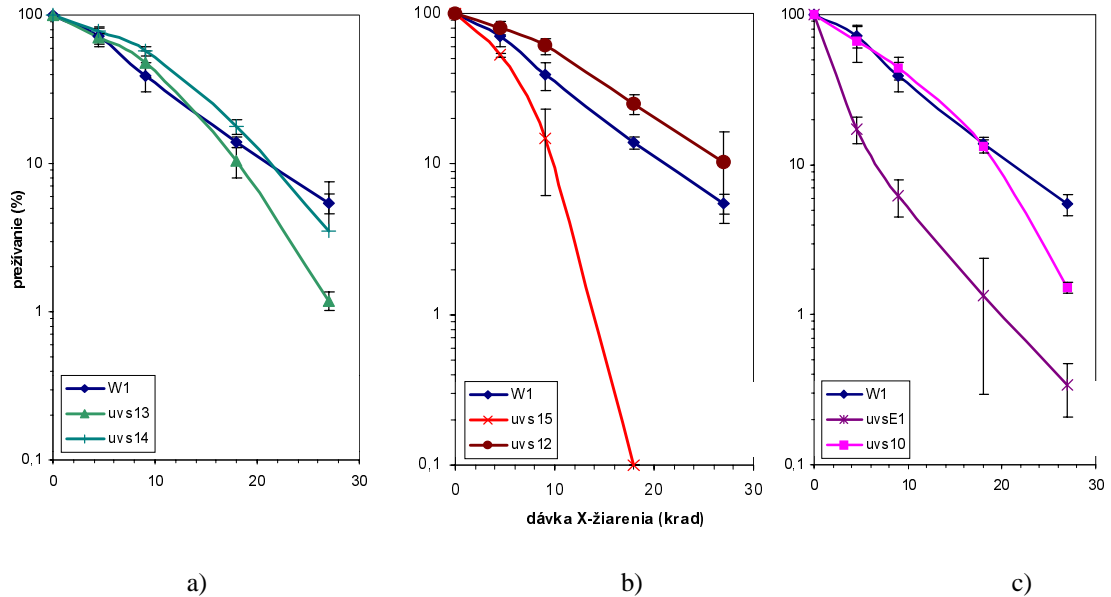
Obr. 5.2 Prežívania štandardného kmeňa W1 a reparačne-deficitných mutantov *C. reinhardtii* po pôsobení MNNG: (a) prežívania štandardného kmeňa W1 a mutantu *uvs13* s doteraz nedefinovanou poruchou reparačného mechaizmu (b) prežívania štandardného kmeňa W1 a mutantov *uvs9* a *uvs15* s poruchou excíznej opravy (c) prežívania štandardného kmeňa W1 a rekombinačne-deficitného kmeňa *uvsE1*.

Kmeň	Dávka X-žiarenia (krad/hod)	Prežívanie	Zastúpenie buniek odumretých pred delením zo všetkých odumretých buniek	Zastúpenie buniek odumretých po delení zo všetkých odumretých buniek
WI	K	100	73,15	26,85
	4,5	66,6	57,36	42,64
	9	47,36	60,29	39,71
	18	16,29	54,16	45,84
	27	3,765	55,29	44,71
uvs10	K	100	76,0	24,0
	4,5	86,27	12,63	88,37
	9	44,15	27,59	72,41
	18	13,27	3,18	96,92
	27	2,57	8,96	91,04
uvs12	K	100	78,79	22,21
	4,5	80,465	67,96	32,04
	9	53,37	66,06	33,94
	18	25,11	69,56	30,44
	27	10,22	67,48	32,52
uvs13	K	100	89,48	10,52
	4,5	72,97	37,5	62,5
	9	51,49	31,36	68,64
	18	10,415	43,54	56,46
	27	1,19	22,09	77,91
uvs14	K	100	71,56	29,44
	4,5	78,38	47,1	52,9
	9	56,64	12,73	87,27
	18	19,14	4,61	95,39
	27	8,3	1,6	98,4
uvs15	K	100	78,27	21,73
	4,5	54,05	57,5	42,5
	9	13,51	66,4	33,6
	18	0	-	-
	27	0	-	-
uvsE1	K	100	70,81	29,19
	4,5	31,25	24,87	75,13
	9	6,39	42,78	57,22
	18	1,47	34,94	65,06
	27	0,2	24,65	75,35

Tab. 5.2 Prežívanie štandardného kmeňa WI a reparačne-deficitných mutantov *C. reinhardtii* po pôsobení X-žiarenia prepočítané na 100 % kontrolu. Výsledky analýzy odumierania buniek pred a po delení.



Obr. 5.3 Prežívania štandardného kmeňa W1 a reparačne-deficitných mutantov *C. reinhardtii* po pôsobení X-žiarenia.



Obr. 5.4 Prežívania štandardného kmeňa W1 a reparačne-deficitných mutantov *C. reinhardtii* po pôsobení X-žiarenia: (a) prežívania štandardného kmeňa W1 a mutantov *uvs13* a *uvs14* s doteraz nedefinovanou poruchou reparačného mechaizmu (b) prežívania štandardného kmeňa W1 a mutantov *uvs12* a *uvs15* s poruchou excíznej opravy (c) prežívania štandardného kmeňa W1 a rekombinačne-deficitných kmeňov *uvsE1* a *uvs10*.

5.1.2 Mutabilita po pôsobení MNNG a X-žiarenia

Mutabilitu sme pri reparačne-deficitných kmeňoch hodnotili na základe výskytu mutačných zmien vedúcich k rezistencii na streptomycín. Hodnotenie sme robili vizuálne zrátaním mutantných kolónií. Frekvenciu mutácií je potrebné robiť v kombinácii so stanovením percenta prežívania, pretože frekvencia mutácií sa určuje vzhľadom k počtu prežívajúcich buniek. Výsledky hodnotenia mutačných zmien po pôsobení MNNG sú zhrnuté v Tab. 5.3 a po pôsobení X-žiarenia v Tab. 5.4.

V prípade MNNG sme zistili nižšiu frekvenciu výskytu streptomycín rezistentných kolónií v porovnaní so štandardným typom pri kmeňoch *uvr9* a *uvr15*. Pri kmeňoch *uvr13* a *uvrE1* sa mutabilita oproti štandardnému kmeňu výrazne nelíšila.

Dávka / Kmeň	W1	<i>uvr9</i>	<i>uvrE1</i>	<i>uvr13</i>	<i>uvr15</i>
K	0,385	0	2,03	4,24	0
50	18,6	4,98	6,84	11,5	2,85
100	24,66	3,64	23,92	32,73	17,21
200	42,6	28,32	58,7	60,76	3,3

* dávka sa udáva v (µg/ml)

Tab. 5.3 Frekvencia priamych mutácií vedúcich k rezistencii na streptomycín pri reparačne-deficitných kmeňoch *C. reinhardtii* po pôsobení MNNG (počet mutantov na milión prežívajúcich buniek).

V prípade X-žiarenia sme zistili vyššiu mutabilitu v porovnaní so štandardným kmeňom pri rekombinačne deficitných kmeňoch *uvrE1* a *uvr10* a zvýšenú aj pri kmeni *uvr14*, ktorý sa javí ako zaujímavý mutant z hľadiska hodnotenia mutability. Tento kmeň vykazuje tzv. mutátorový fenotyp, t.j. zvýšenú frekvenciu spontánnych a indukovaných mutácií (Vlček, 1997). Kmeň *uvr15* nemutoval vôbec a kmeň *uvr12* vykazoval zníženú mutabilitu v porovnaní so štandardným typom.

Dávka / kmeň	W1	<i>uvrE1</i>	<i>uvr10</i>	<i>uvr12</i>	<i>uvr13</i>	<i>uvr14</i>	<i>uvr15</i>
K	0,5	1,15	1,15	0,4	0,52	4,21	0
4,5	4,6	37,9	20,06	0	5,8	11,86	0
9	4,8	100,88	13,06	0,5	11,23	11,42	0
18	2,5	37,3	7,5	0,5	7,95	5,35	0
27	0	3,04	2,33	0	4,85	3,6	0

* dávka sa udáva v krad

Tab. 5.4 Frekvencia priamych mutácií vedúcich k rezistencii na streptomycín pri reparačne-deficitných kmeňoch *C. reinhardtii* po pôsobení X-žiarenia (počet mutantov na milión prežívajúcich buniek).

Z hľadiska prežívania po pôsobení oboch použitých mutagénov (MNNG, X-žiarenie) sa ako najcitlivejší javil kmeň *uvr15* s predpokladanou poruchou mutagénnej opravy. Tento kmeň vykazoval aj veľmi nízku (po pôsobení MNNG), resp. žiadnu (po pôsobení X-žiarenia) indukovanú mutabilitu. Kmeň *uvrE1*, s poruchou rekombinačného mechanizmu, takisto citlivo reagoval na oba použité mutagény. Excízne deficitné kmene (*uvr9*, *uvr12*) nereagovali zvýšenou citlivosťou na použité mutagény, kmeň *uvr12* sa dokonca javil rezistentnejší voči X-žiareniu ako štandardný kmeň. Zaujímavé bolo zníženie frekvencie priamych mutácií vedúcich k rezistencii na streptomycín po pôsobení MNNG pri kmene *uvr9*. Z hľadiska mutability je takisto zaujímavým aj kmeň *uvr14*, ktorý vykazoval zvýšenú spontánnu aj indukovanú mutabilitu po pôsobení X-žiarenia.

5.2 Vyštiepovanie pyrimidínových dimérov pri reparačne-deficitných mutantoch *C. reinhardtii*

Na sledovanie vyštiepovania pyrimidínových dimérov sme použili enzymatickú metódu podľa Small a Greinmann (1977). Rádioaktívne značenú DNA reparačne-deficitných kmeňov *C. reinhardtii* sme po ovplyvnení UV žiarením izolovali a štiepili UV špecifickou endonuklázou, štiepiacou DNA práve v miestach pyrimidínových dimérov. Po izolácii, štiepení a centrifugácii DNA v sacharózovom gradiente sme merali množstvo DNA v jednotlivých frakciách. Na základe grafického hodnotenia sme sledovali, či po 24

hodinách inkubácie v tme dochádza k posunu z nízkomolekulárnych frakcií DNA, ktoré reprezentujú DNA s nevyštiepenými dimérmi, do vysokomolekulárnych frakcií, t.j. DNA s vyštiepenými dimérmi.

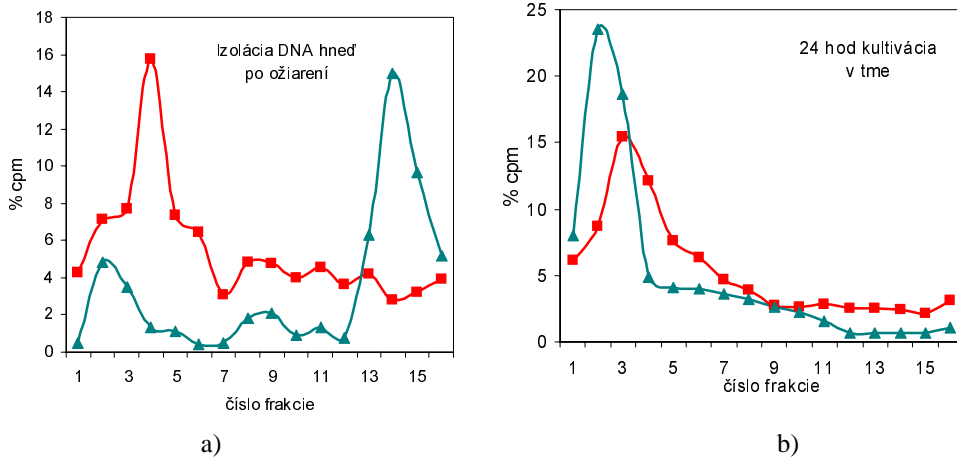
Výsledky získané centrifugáciou štiepenej DNA v hustotných gradientoch sú zaznačené v grafoch 5.5 – 5.10. Pri každom kmeni sme izolovali DNA hneď po ovplyvnení UV žiarením a po 24 hodinovej kultivácii v tme, aby sme zabránili fotoreaktivácii. Izolovanú DNA sme potom ešte rozdelili na dve vzorky. Jednu vzorku sme centrifugovali v sacharózovom gradiente bez predchádzajúcej kultivácie s UV endonukleázou, do druhej sme pridali UV endonuklázu, inkubovali 30 min. na vodnom kúpeli a až potom centrifugovali v sacharózovom gradiente. Vzorka bez UV endonuklázy nám poskytovala informáciu, či počas manipulácie s vyizolovanou DNA nedošlo k jej mechanickému poškodeniu.

Ako kontroly sme použili štandardný kmeň *wl*, ktorý nemá narušenú excíznu reparačnú dráhu a excízne defektný kmeň *uvs9*.

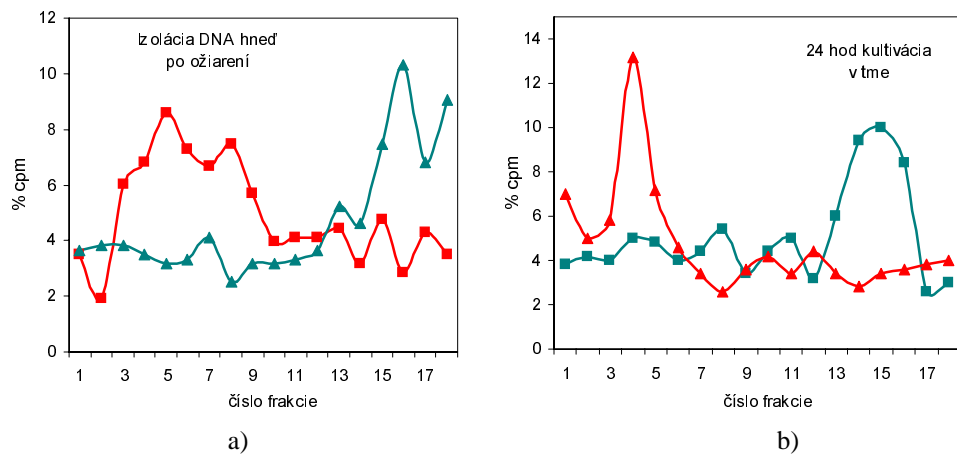
Graf 5.5a ukazuje, že vo vzorke ovplyvnenej UV endonukleázou došlo k poštiepeniu DNA izolovanej zo štandardného kmeňa *wl* hneď po ovplyvnení UV žiarením a vrchol grafu sa posunul do oblasti nízkomolekulárnej DNA. Na grafe 5.5b môžeme sledovať obnovenie vysokomolekulárnej frakcie, čo naznačuje, že došlo k odstráneniu pyrimidínových dimérov z DNA štandardného kmeňa.

Pri kmeni *uvs9* (graf 5.6), pri ktorom bola dokázaná úplná porucha v excíznej oprave, pretrváva DNA v podobe nízkomolekulárnych frakcií aj po 24 hodinách kultivácie v tme. To znamená, že ani po 24 hodinách nedošlo k odstráneniu pyrimidínových dimérov.

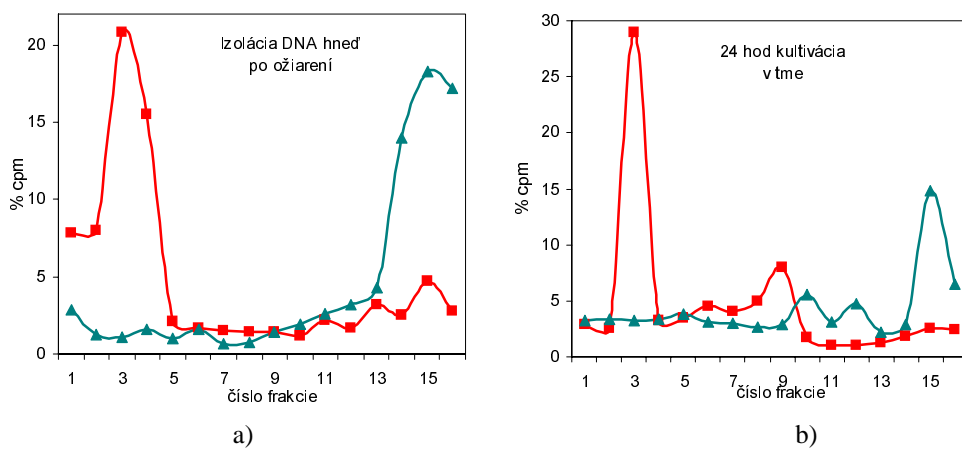
Z ďalších grafov vyplýva, že ani pri kmeňoch *uvs12* (5.7) a *uvs15* (5.10) nedošlo k obnoveniu vysokomolekulárnej frakcie a teda k odstráneniu pyrimidínových dimérov. Naproti tomu pri kmeňoch *uvs13* (5.8) a *uvs14* (5.9) vidíme posun z nízkomolekulárnych frakcií do vysokomolekulárnych frakcií DNA, podobne, ako je tomu pri štandardnom kmeni *wl*.



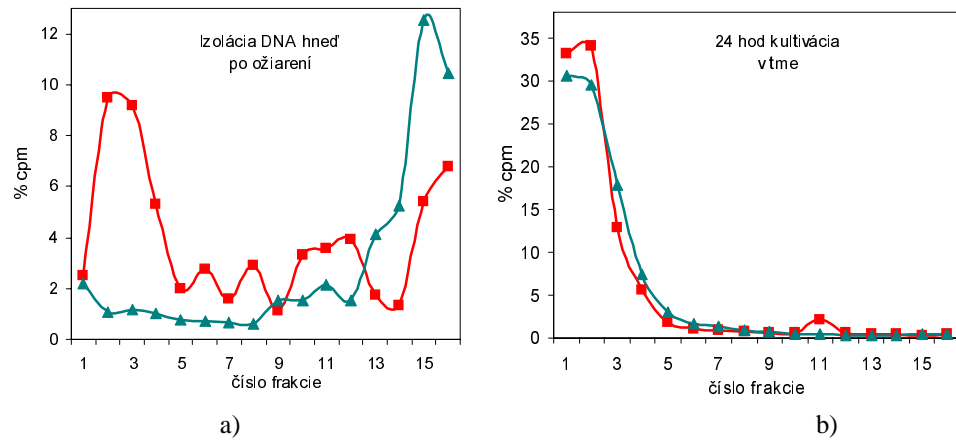
Obr. 5.5 Sedimentácia DNA izolovanej zo štandardného kmeňa *WI*: (a) DNA izolovaná hneď po ožiarení, (b) DNA izolovaná po 24-hod. kultivácii v tme, červená čiara – vzorka bez UV endonukleázy, zelená čiara – vzorka s UV endonukleázou.



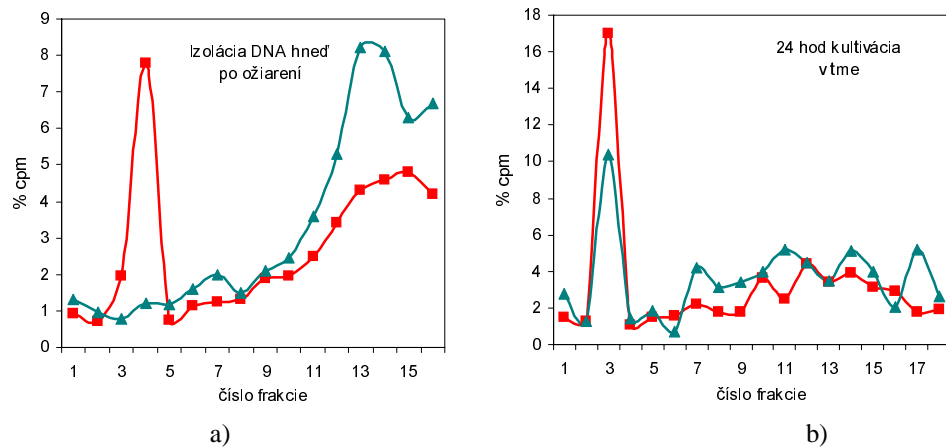
Obr. 5.6 Sedimentácia DNA izolovanej z excízne-deficitného kmeňa *uvs9*: (a) DNA izolovaná hneď po ožiarení, (b) DNA izolovaná po 24-hod. kultivácii v tme, červená čiara – vzorka bez UV endonukleázy, zelená čiara – vzorka s UV endonukleázou.



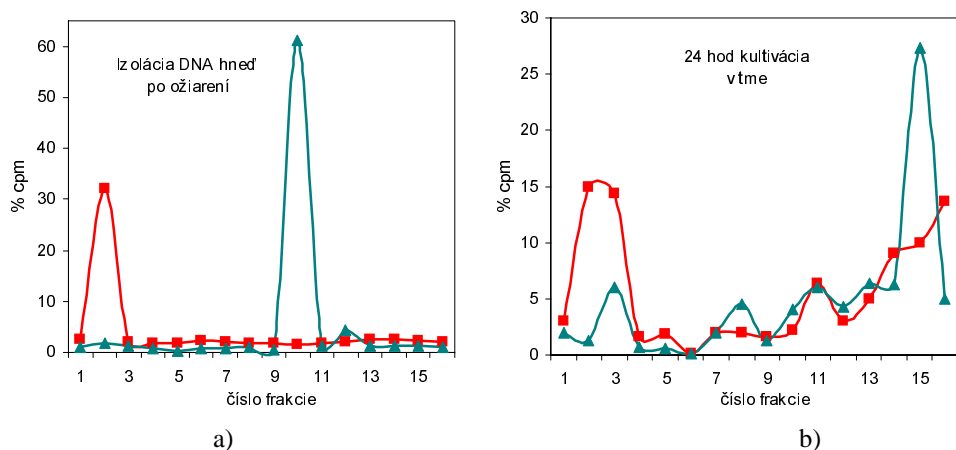
Obr. 5.7 Sedimentácia DNA izolovanej z kmeňa *uvs12*: (a) DNA izolovaná hneď po ožiarení, (b) DNA izolovaná po 24-hod. kultivácii v tme, červená čiara – vzorka bez UV endonukleázy, zelená čiara – vzorka s UV endonukleázou.



Obr. 5.8 Sedimentácia DNA izolovanej z kmeňa *uvs13*: (a) DNA izolovaná hneď po ožiarení, (b) DNA izolovaná po 24-hod. kultivácii v tme, červená čiara – vzorka bez UV endonukleázy, zelená čiara – vzorka s UV endonukleázou.



Obr. 5.9 Sedimentácia DNA izolovanej z kmeňa *uvs14*: (a) DNA izolovaná hneď po ožiarení, (b) DNA izolovaná po 24-hod. kultivácii v tme, červená čiara – vzorka bez UV endonukleázy, zelená čiara – vzorka s UV endonukleázou.



Obr. 5.10 Sedimentácia DNA izolovanej z kmeňa *uvs15*: (a) DNA izolovaná hneď po ožiarení, (b) DNA izolovaná po 24-hod. kultivácii v tme, červená čiara – vzorka bez UV endonukleázy, zelená čiara – vzorka s UV endonukleázou.

5.3 Genetická analýza

V rámci genetickej analýzy sme určovali alelizmus mutantných kmeňov s predpokladanou alebo už dokázanou poruchou excízneho reparačného mechanizmu. Pomocou rekombinačnej analýzy sme sledovali vyštiepovanie štandardného typu v potomstve zygót z krížení reparačne-deficitných kmeňov. Rekombinačné stanovenie alelizmu mutantov sme robili tetrádovou analýzou (Harris, 1989). Keďže reparačno-deficitné kmene s poruchou excíznej opravy mali nízku párovaciu schopnosť a zníženú životaschopnosť zygót a spór, urobili sme aj testovanie na úrovni zygót.

Získané výsledky sú uvedené v Tab. 5.5. Vyštiepovanie štandardného typu pri väčšine krížení potvrdilo, že gény nie sú alelické. V prípade krížení, pri ktorých sa nevyštiepil štandardný typ (*uvs1 x uvs371*, *uvs9 x uvs351*, *uvs12 x uvs15*), bolo potrebné získaný údaj doplniť výsledkami analýzy na úrovni zygót, pretože pri génoch v silnej väzbe sa v závislosti na počte analyzovaných tetrád nemusí štandardný typ vyštiepovať, aj keď sú mutantné kmene alelické. Pri krížení *uvs12 x uvs15* sme pomocou analýzy na úrovni zygót potvrdili obnovenie štandardného fenotypu diploida, čo znamenalo, že pri krížených kmeňoch ide o mutácie v rôznych génoch. Výnimkou boli kríženia *uvs1 x uvs371* a *uvs9 x uvs351*, pri ktorých sme ani pomocou analýzy na úrovni zygót nepotvrdili obnovenie štandardného fenotypu.

Na základe získaných výsledkov môžeme uvažovať, že v tejto skupine mutantov ide o 4 samostatné gény určujúce citlivosť k UV žiareniu.

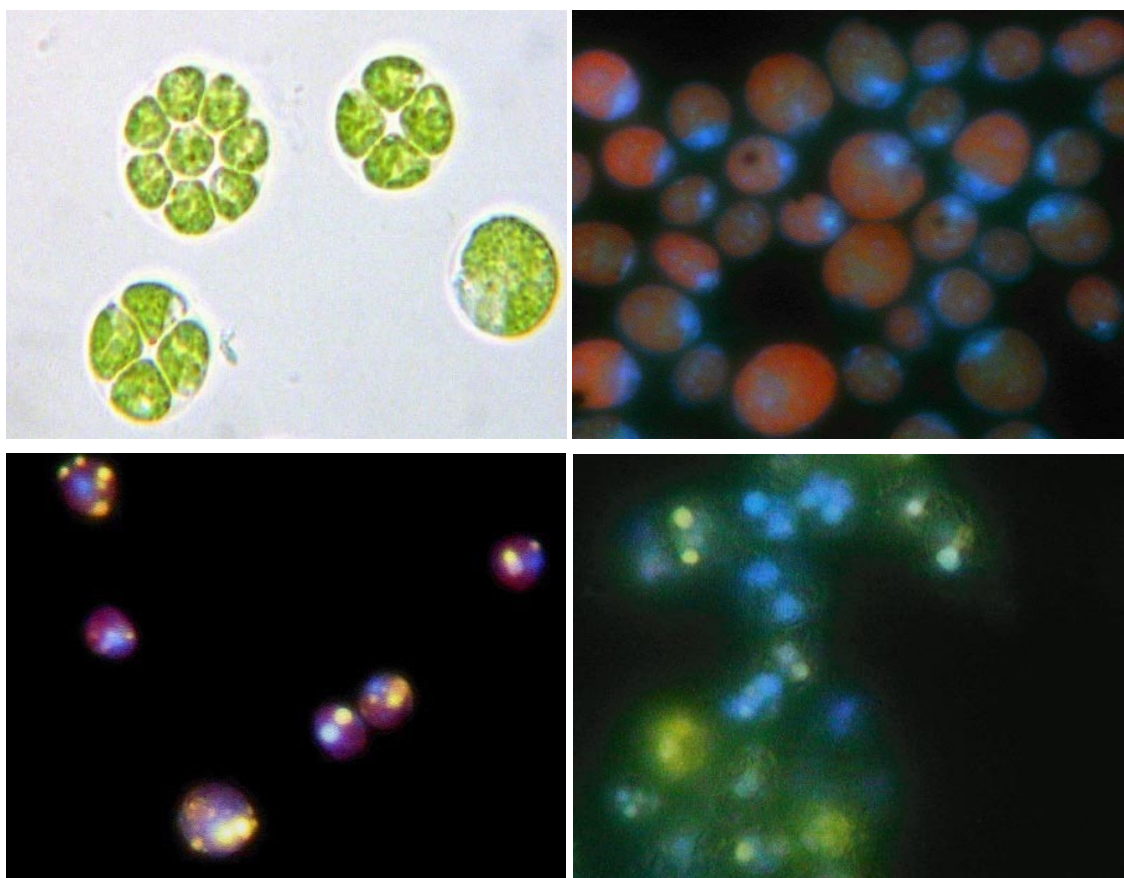
Kríženie	Počet tetrád/spór	Vyštiepovanie štandardného typu	Analýza zygóty - vyštiepovanie št. typu	Záver
<i>uvs1 x uvs9</i>	2/25	+		+
<i>uvs1 x uvs12</i>	13/12	+	+	+
<i>uvs1 x uvs15</i>	8/47 *	+	+	+
<i>uvs1 x uvs351</i>	0/6 *	+		+
<i>uvs1 x uvs371</i>	39/53*	-	-	-
<i>uvs9 x uvs12</i>	4/42	+		+
<i>uvs9 x uvs15</i>	12/0 *	+	+	+
<i>uvs9 x uvs351</i>	28/0 *	-	-	-
<i>uvs12 x uvs15</i>	15/0	-	+	+
<i>uvs12 x uvs351</i>	6/23*	+		+
<i>uvs15 x uvs351</i>	6/0	+	+	+
<i>uvs15 x uvs371</i>	1/43 *	+	+	+
<i>uvs351 x uvs371</i>	10/0*	+		+

Tab 5.5 Vyštiepovanie štandardného typu pri krížení reparačno-deficitných mutantov *C. reinhardtii* (* malá párovacia schopnosť krížených kmeňov, resp. slabá životaschopnosť spór; + vyštiepenie štandardného typu; - mutantný fenotyp).

5.4 Vplyv mikrotubulového jedu metyl benzimidazol 2-yl-karbamátu (MBC) na zastavenie bunkového cyklu riasy *C. reinhardtii* využitím fluorescenčnej mikroskopie

Pri farbení buniek *C. reinhardtii* pomocou fluorochrómu DAPI sme museli brať do úvahy dva problémy súvisiace s týmto modelovým objektom.

Prvým problémom bola slabá penetrancia silnej bunkovej steny riasy. Keďže najväčšie ťažkosti nastávajú pri farbení starých bunkových kultúr, pred začatím pokusov sme bunky vždy preniesli do čerstvého média a nechali rásť ďalších 24 hodín. Priestupnosť bunkovej steny sa zvýšila aj následným 12-hodinovým zmrazením bunkového sedimentu a ovplyvnením 2 % SDS.



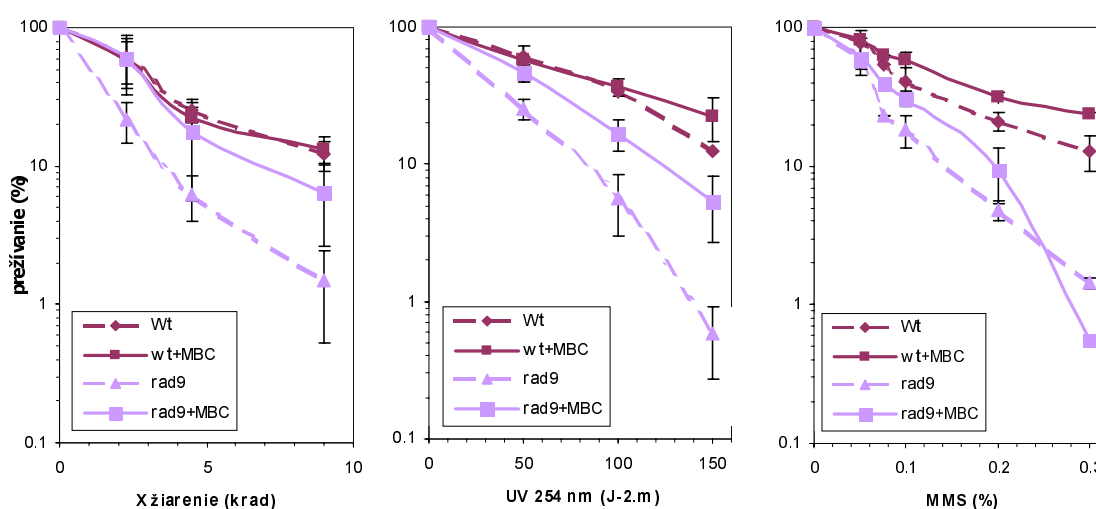
Obr. 5.11 Fotografie získané zo svetelnej (a) a fluorescenčnej (b-d) mikroskopie riasy *C. reinhardtii*. a) bunky štandardného kmeňa *C. reinhardtii* na konci bunkového cyklu pred uvoľnením z materskej bunovej steny, b) bunky zafarbené flurochrómom DAPI, c) bunky ovplyvnené MBC v skoršej rastovej fáze, viditeľné sú len jednojadrové bunky, d) bunky s rôznym počtom jadier, prídanie MBC v neskoršej rastovej fáze

Druhým problémom súvisiacim s fluorescenčnou mikroskopiou pri riasach *C. reinhardtii* bola interferencia primárnej fluorescencie chlorofylu so sekundárnou fluorescenciou DAPI. Chloroplast, ktorý pri *C. reinhardtii* zaberá až 40 % objemu bunky, sme preto odfarbili pomocou zmesi formaldehydu a metanolu (1:1). Na odfarbenie je možné použiť aj zmes acetónu a etanolu v rovnakom pomere.

Výsledky fluorescenčnej mikroskopie sú zobrazené na obr. 5.11. Z výsledkov vyplýva, že pridanie MBC v skoršej rastovej fáze vedie k zastaveniu bunkového cyklu, pretože sme pozorovali len jednojadrové bunky (Obr. 5.11c). Pridanie MBC v neskoršej rastovej fáze nezastavuje bunkový cyklus, čo sa prejavilo prítomnosťou 2-, 4- a viacjadrových buniek (Obr. 5.11d).

5.5 Prežívanie mutantného kmeňa *rad9* *S. cerevisiae* po pôsobení UV-žiarenia, X-žiarenia a MMS a sledovanie vplyvu MBC na zmenu jeho prežívania

Výsledky hodnotenia účinku UV-žiarenia, X-žiarenia a MMS na prežívanie buniek štandardného kmeňa a mutantného kmeňa *rad9* bez zastavenia bunkového cyklu a so zastavením bunkového cyklu pomocou MBC sú znázornené na grafe 5.12 a v tabuľke 5.6.



Obr. 5.12 Vplyv mikrotubulového jedu benzimidazol 2-yl-karbamátu na prežívanie štandardného kmeňa a *rad9* mutantu *S. cerevisiae* po pôsobení X-žiarenia, UV-žiarenia a MMS.

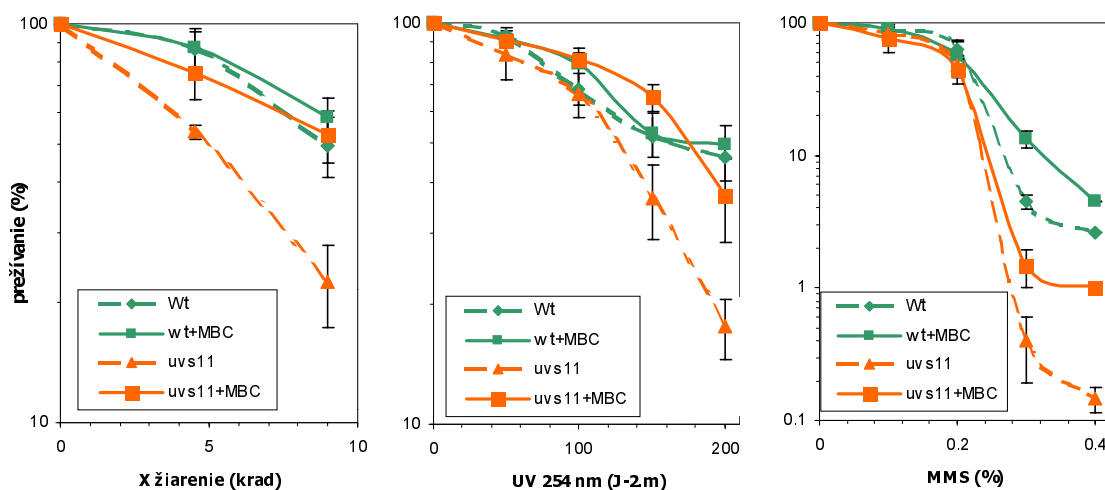
<i>Kmeň</i>	<i>Dávka X-žiarenia (krad)</i>	<i>Prežítvanie (%)</i>	<i>Dávka UV-žiarenia (J.m²)</i>	<i>Prežítvanie (%)</i>	<i>Koncentrácia MMS (%)</i>	<i>Prežítvanie (%)</i>
<i>wt</i>	K	100	K	100	K	100
	2,25	61.6	50	60,41	0,05	77,65
	4,5	25.4	100	33,53	0,1	40,83
	9	12.07	150	12,43	0,2	21,05
					0,3	12,79
<i>wt + MBC</i>	K	100	K	100	K	100
	2,25	58.22	50	57,14	0,05	81,43
	4,5	22.01	100	36,88	0,1	58,19
	9	13.25	150	22,43	0,2	31,29
					0,3	23,75
<i>rad9</i>	K	100	K	100	K	100
	2,25	21.68	50	25,6	0,05	57,01
	4,5	6.25	100	5,64	0,1	18,26
	9	1.49	150	0,59	0,2	4,79
					0,3	1,44
<i>rad9 + MBC</i>	K	100	K	100	K	100
	2,25	59.21	50	46,44	0,05	60,17
	4,5	17.37	100	16,65	0,1	30,89
	9	6.44	150	5,4	0,2	9,49
					0,3	0,56

Tab. 5.6 Prežítvanie štandardného kmeňa *wt* a reparačne-deficitného kmeňa *rad9 S.cerevisiae* po pôsobení X-žiarenia, UV-žiarenia a MMS prepočítané na 100% kontrolu (K).

Pri sledovaní fenotypového prejavu *rad9* kmeňa *S. cerevisiae* po pôsobení všetkých troch typov použitých mutagénov sme zistili citlivosť *rad9* mutanta pri porovnaní so štandardným typom. Pridanie MBC malo pri štandardnom kmeni len malý vplyv na prežítvanie buniek po ovplyvnení UV-žiarením, X-žiarením a MMS. Naopak, pri mutantnom kmeni viedlo pridanie MBC k zvýšeniu prežítvania po pôsobení UV- a X-žiarenia oproti variantám bez MBC. Po ovplyvnení MMS sme pri *rad9* kmeni pozorovali len malý vplyv MBC. Pri žiadnom mutagéne sa prežítvanie mutantného kmeňa neobnovilo až na úroveň štandardného kmeňa.

5.6 Prežívanie mutantného kmeňa *uvs11 C. reinhardtii* po pôsobení UV-žiarenia, X- žiarenia a MMS a sledovanie vplyvu MBC na zmenu prežívania

Výsledky hodnotenia účinku UV-žiarenia, X-žiarenia a MMS na prežívanie buniek štandardného kmeňa a mutantného kmeňa *uvs11* bez zastavenia bunkového cyklu a so zastavením bunkového cyklu pomocou MBC sú znázornené na grafe 5.13 a v tabuľkách 5.7 – 5.9.



Obr 5.13 Vplyv mikrotubulového jedu benzimidazol 2-yl-karbamátu na prežívanie štandardného kmeňa a *uvs11*mutanta *C. reinhardtii* po pôsobení X-žiarenia, UV-žiarenia a MMS.

Pri sledovaní fenotypového prejavu *uvs11* mutantu rias *C. reinhardtii* po pôsobení použitých mutagénov vidieť značný rozdiel v citlivosti mutantu oproti štandardnému typu, podobne ako je tomu pri *rad9* mutantovi *S. cerevisiae*. Evidentný je aj rozdiel v citlivosti *uvs11* mutantného kmeňa na použité mutagény bez pôsobenia MBC a po jeho pôsobení. Zastavenie bunkového cyklu pomocou mikrotubulového inhibítora MBC viedlo k výraznému zvýšeniu prežívania mutantného kmeňa *uvs11* v prípade ovplyvnenia UV-, X-žiarenia i MMS.

Kmeň	Dávka X-žiarenia (krad)	Prežívanie (%)	Zastúpenie buniek odumretých pred delením zo všetkých odumretých buniek	Zastúpenie buniek odumretých po delení zo všetkých odumretých buniek
<i>wI</i>	K	100	79,76	20,23
	4,5	86,2	58,34	41,66
	9	49,7	54,83	45,17
<i>wI + MBC</i>	K	100	82,11	17,89
	4,5	86,9	80,76	19,23
	9	58,1	81,67	18,33
<i>uvs11</i>	K	100	77,18	22,82
	4,5	53,49	12,58	87,42
	9	22,59	6,5	93,5
<i>uvs11 + MBC</i>	K	100	75,09	24,91
	4,5	75,51	81,57	18,42
	9	52,6	93,8	6,2

Tab. 5.7 Prežívanie štandardného kmeňa *wI* a mutanta *uvs11 C. reinhardtii* po pôsobení X-žiarenia prepočítané na 100 % kontrolu (K). Výsledky analýzy odumierania buniek pred a po delení.

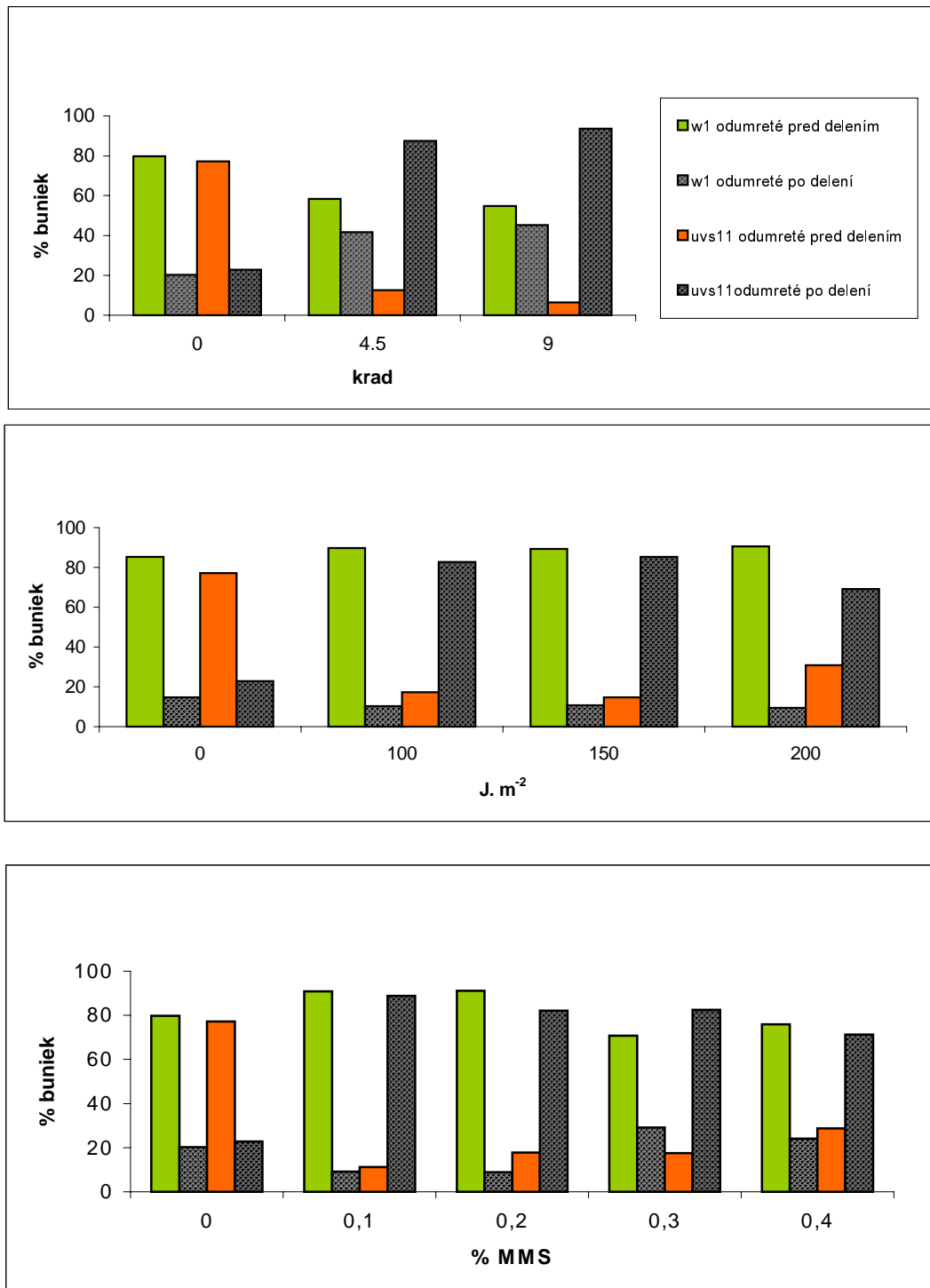
Kmeň	Dávka UV-žiarenia (J.m ⁻²)	Prežívanie (%)	Zastúpenie buniek odumretých pred delením zo všetkých odumretých buniek	Zastúpenie buniek odumretých po delení zo všetkých odumretých buniek
<i>wI</i>	K	100	85,29	14,71
	50	93,08		
	100	68,24	89,75	10,25
	150	52,18	89,34	10,66
	200	46,25	90,59	9,41
<i>wI + MBC</i>	K	100	95,27	4,73
	50	91,66		
	100	79,27	95,74	4,26
	150	53,2	95,77	4,23
	200	49,94	94,45	5,55
<i>uvs11</i>	K	100	2,69	97,31
	50	83,73		
	100	66,35	17,3	82,7
	150	36,65	14,65	85,35
	200	17,5	30,85	69,15
<i>uvs11 + MBC</i>	K	100	81,4	18,6
	50	90,19		
	100	81,15	81,25	18,75
	150	65,16	84,33	15,67
	200	37,23	91,17	8,83

Tab. 5.8 Prežívanie štandardného kmeňa *wI* a mutanta *uvs11 C. reinhardtii* po pôsobení UV-žiarenia prepočítané na 100 % kontrolu (K). Výsledky analýzy odumierania buniek pred a po delení.

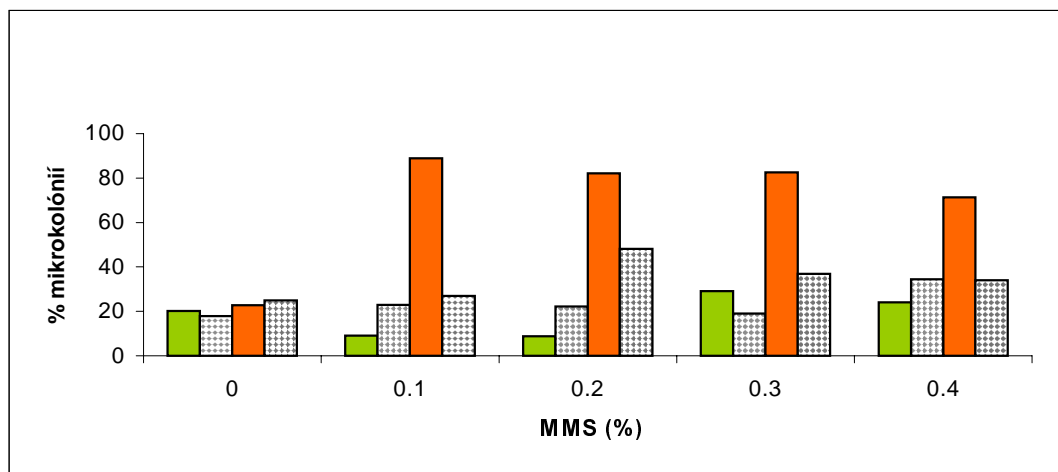
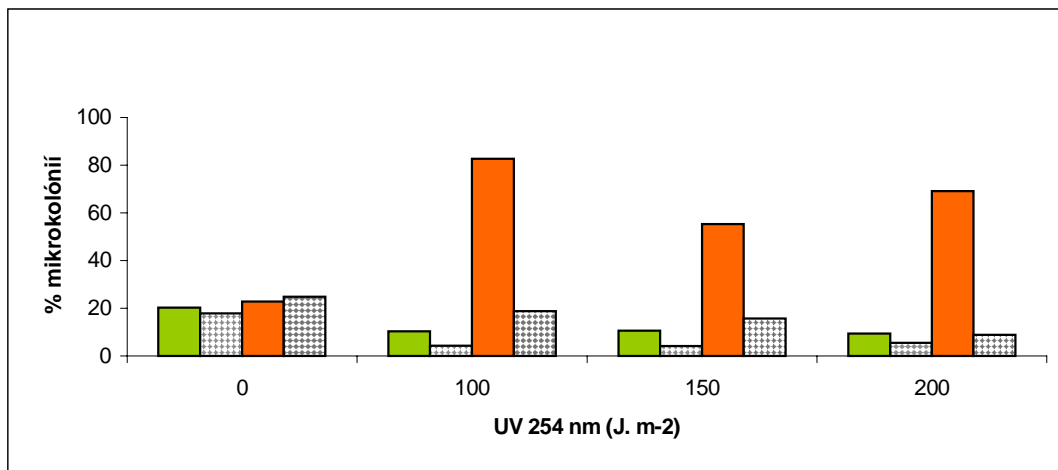
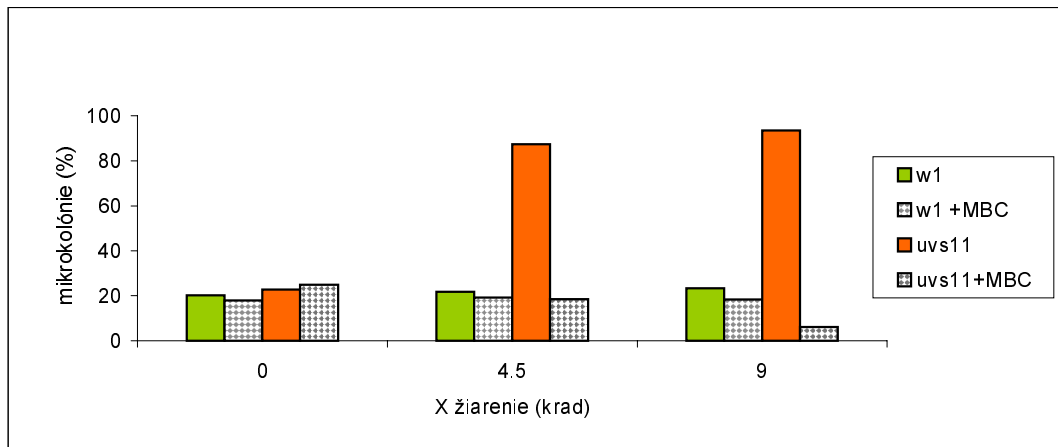
Kmeň	Koncentrácia MMS (%)	Prežívanie (%)	Zastúpenie buniek odumretých pred delením zo všetkých odumretých buniek	Zastúpenie buniek odumretých po delení zo všetkých odumretých buniek
<i>w1</i>	K	100	79,76	20,23
	0,1	88,54	90,95	9,05
	0,2	63,49	91,12	8,88
	0,3	4,49	70,75	29,25
	0,4	2,62	75,86	24,14
<i>w1 + MBC</i>	K	100	82,11	17,89
	0,1	90,46	76,98	23,02
	0,2	55,78	77,81	22,19
	0,3	13,38	81,03	18,97
	0,4	4,49	65,55	34,45
<i>uvs11</i>	K	100	77,18	22,82
	0,1	81,63	11,2	88,8
	0,2	48,43	17,9	82,1
	0,3	0,4	17,46	82,54
	0,4	0,145	28,7	71,3
<i>uvs11 + MBC</i>	K	100	75,09	24,91
	0,1	75,49	73,1	26,9
	0,2	44,5	51,78	48,22
	0,3	1,47	63,14	36,86
	0,4	1,0	65,95	34,05

Tab. 5.9 Prežívanie štandardného kmeňa *w1* a mutanta *uvs11* *C. reinhardtii* po pôsobení MMS prepočítané na 100 % kontrolu (K). Výsledky analýzy odumierania buniek pred a po delení.

Výsledky analýzy odumierania buniek pred a po rozdelení sú uvedené v tab 5.7 – 5.9 a na obr. 5.14 a 5.15. Bunky mutantného kmeňa *uvs11* ovplyvnené mutagénom sa rozdelia pred odumretím minimálne jedkrát, následkom čoho vznikajú mikrokolónie s neživotaschopnými bunkami (Vlček et al., 1987). Po zastavení bunkového cyklu pomocou MBC pri kmeni *uvs11* došlo k výraznému zníženiu počtu mikrokolónií a naopak, zvýšil sa počet odumretých buniek pred delením.



Obr. 5.14 Pomer počtu buniek *C. reinhardtii* odumretých pred delením k počtu buniek, ktoré sa pred odumretím minimálne jedenkrát rozdelia po pôsobení X-žiarenia, UV-žiarenia a MMS.



Obr. 5.15 Vplyv mikrotubulového inhibítora MBC na počet mikrokolónii štandardného kmeňa a *uvs11* mutanta *C. reinhardtii* po pôsobení X-žiarenia, UV-žiarenia a MMS.

5.7 Transformácia jadrového genómu *C. reinhardtii*

Viacere pokusy o úspešnú transformáciu jadrového genómu riasy *C. reinhardtii* na našom pracovisku nevedli k želateľným výsledkom. Preto sme sa po konzultácii s pracovníkmi Oddelenia molekulovej genetiky Univerzity v Ženeve rozhodli pre transformáciu použiť kmene deficitné v syntéze arginínu. Kmeň *cw15arg7.8* a plazmid pARG7.8 nám poskytol Prof. Rochaix (Univerzita v Ženeve).

5.7.1 Izolácia plazmidu pARG7.8

Na transformáciu buniek *C. reinhardtii* sme použili plazmid pARG7.8, ktorý nesie ako selektívny marker funkčný gén pre arginínsukcinátlyázu. Podľa skúseností pracovníkov Oddelenia molekulovej genetiky Univerzity v Ženeve sme vedeli, že na úspešnosť transformácie vplýva aj čistota plazmidovej DNA (pDNA). Pracovali sme preto s tromi variantami plazmidovej DNA. Prvý variant (variant I) sme získali od Prof. Rochaixa z Univerzity v Ženeve. Ďalšie dva varianty sme izolovali z bakteriálneho kmeňa *E. coli* XL1-Blue a navzájom sa líšili spôsobom izolácie. Variant II bol izolovaný pomocou komerčného kitu „High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Boehringer Mannheim) a variant III sme izolovali metódou podľa Maniatis a kol. (1982).

Izoláciu plazmidu sme overili elektroforeticky pomocou restriktívnej analýzy s enzýmom NcoI.

5.7.2 Hodnotenie účinnosti transformácie

Na transformáciu sme použili kmene *cw15arg7.8 C. reinhardtii* (mutantný kmeň bez bunkovej steny deficitný v syntéze arginínu) a *cc51* (mutantný kmeň s bunkovou stenou deficitný v syntéze arginínu) neschopné rásť na minimálnom médiu. Použili sme metódu využívajúcu sklenené guľičky a PEG

Pri kmeni *cc51* sme pred samotnou transformáciou odstránili bunkovú stenu pomocou nami izolovaného gametického lytického enzýmu autolyzínu (viď 4.12.4 a 4.12.5).

Pri každom variante sme transformovali rovnaký počet buniek, 3×10^7 buniek/ml. V tabuľkách sú uvedené priemerné hodnoty získané minimálne z troch experimentov pre každý variant.

Súčasťou transformačnej zmesi je aj polyetylén glykol (PEG). Zaujímalo nás, či môže ovplyvniť prežívanie buniek a preto sme hodnotili percento prežívania po pôsobení troch rôznych koncentrácií PEG-u 8000 (1; 2,5 a 5%). Zistili sme, že prežívanie buniek sa výrazne nelíši v jednotlivých variantoch a kontrole (70,65 % v kontrole, 62,5% pri 1% PEG, 73,1% pri 2,5% PEG a 75% pri 5% PEG), pričom najlepšie prežívanie sme získali pri najvyššej koncentrácii PEG-u.

Pri transformácii kmeňa *cw15arg7.8* sme použili dva druhy PEG-u, ktoré sa líšili molekulovou hmotnosťou (PEG6000 a PEG8000). Pri transformácii kmeňa *cc51* sme použili PEG8000.

Hodnotenie účinnosti transformácie je uvedené v tabuľkách 5.10 a 5.11. Transformanty sme selektovali tri týždne po transformácii nepriamou metódou, na základe ich schopnosti rásť na minimálnom médiu, ktorú nadobudli po komplementácii mutantného génu *arg7.8* funkčným génom pre arginínsukcinátlyázu. Po vyrastení transformovaných kolónií sme ich opäť preočkovali na nové selektívne médium a výsledky overili.

Na základe predkladaných výsledkov môžeme konštatovať, že na úspešnosť transformácie majú vplyv tieto parametre:

- *čistota plazmidovej DNA* -vyššiu účinnosť transformácie sme dosiahli pri použití pDNA izolovanej pomocou komerčne dostupného kitu
- *koncentrácia a molekulová hmotnosť polyetylén glykolu* – dodnes nie je známy presný mechanizmus účinku PEG-u pri transformácii, avšak naše výsledky potvrdili, že molekulová hmotnosť PEG-u ovplyvňuje účinnosť transformácie. Lepšie výtázky transformantov sme získali s polyetylén glykolom s vyššou molekulovou hmotnosťou (PEG 8000).

- *typ sklenených guličiek* – na základe konzultácie s pracovníkmi Odd. Molek. Biológie Univerzity v Ženeve sme vedeli, že aj typ sklenených guličiek môže vplývať na účinnosť transformácie. Pravdepodobne tu zohráva úlohu jednak priemer guličiek ako aj chemické ošetrenie guličiek ich výrobcom. Preto sme v pokusoch použili sklenené guličky, ktoré sme získali z Univerzity v Ženeve (Thomas Scientific) a sklenené guličky získané z Katedry genetiky UK (nezistený zdroj). Nezistili sme výrazný vplyv na transformačnú účinnosť.
- *genotyp recipientného kmeňa* – pri mutantoch bez bunkovej steny sme dosiahli vyššiu účinnosť transformácie v porovnaní s mutantami, pri ktorých sme bunkovú stenu odstránili autolyzínom
- *čas ovplyvnenia* – najoptimálnejšie výsledky sme dosiahli po ovplyvnení vortexom počas 15 sekúnd. Predĺženie doby vortexovania na 60 sekúnd znižuje počet transformantov. Príčinou môže byť mechanické poškodenie buniek sklenenými guličkami.

<i>cw15arg7.8</i>		<i>PEG6000</i>		<i>PEG8000</i>	
pDNA	Sklenené guličky	počet kolónií na PM	Účinnosť transformácie ($\times 10^{-6}$)	počet kolónií na PM	Účinnosť transformácie ($\times 10^{-6}$)
I	1.	10,5	0,35	204	6,8
	2.	51	1,7	22	0,73
II	1.	51	1,7	478	15,9
	2.	31,5	1,05	89	2,9
III	1.	-	-	18	0,6

Tab. 5.13 Výsledky transformácie kmeňa *cw15arg7.8* (pDNA: I – získaná z Univerzity v Ženeve, II - izolovaná pomocou komerčného kitu „High Pure Plasmid Isolation Kit“, III - izolovaná metódou podľa Maniatis et al. (1982); sklenené guličky: 1. získané z Univerzity v Ženeve, 2. získané z Katedry genetiky).

<i>cc51</i>		<i>PEG 8000</i>	
sklenené guličky	pDNA	počet kolónií na PM	Účinnosť transformácie ($\times 10^{-6}$)
I.	I	35	1,16
	II	7	0,23
	III	3,6	0,12

Tab. 5.14 Výsledky transformácie kmeňa *cc51*.

Kapitola 6

Diskusia

Erwin Schrödinger vo svojej knihe „Čo je život“ vyslovil predpoklad, že makromolekula, v ktorej je zakódovaná celá genetická informácia, by mala byť výnimočne stabilná. Následné objavenie štruktúry DNA však túto predstavu vyvrátilo. Dnes je už známe, že DNA je veľmi dynamickou štruktúrou, ktorá je sústavne vystavovaná poškodeniu spôsobenému rôznymi endogénnymi i exogénnymi vplyvmi. Takéto poškodenie môže viesť k akumulácii mutácií, ktoré v sebe stelesňujú úpadok i zmenu – úpadok jednotlivca a spásu druhu. Rovnováha dosiahnutá medzi udržaním genómovej integrity a evolučnou nevyhnutnosťou mutácií, potrebných pre adaptáciu v nových podmienkach prostredia, je zabezpečená prítomnosťou DNA reparačných systémov v bunke, ktoré nie sú len jednou zo základných charakteristík všetkého živého, ale hrajú aj kľúčovú úlohu v evolúcii a prežití druhov.

Podobne ako iné základné procesy v bunke, aj reparačné mechanizmy sú evolučne konzervované a poznatky získané u jednej skupiny organizmov sa môžu využiť a extrapolovať aj na iné skupiny. Všetky súčasné predstavy o funkcii reparačných systémov a priebehu reparačných procesov sa vytvárali na základe štúdia heterotrofných organizmov. Na druhej strane, o reparačných procesoch fotoautotrofných organizmov

bolo získaných oveľa menej poznatkov. Problémy so štúdiom reparačných mechanizmov u vyšších rastlín súvisia najmä s náročnou izoláciou mutantov. V tejto súvislosti práve *C. reinhardtii*, ktorá svojimi vlastnosťami a zložením pripomína vyššie rastliny, poskytuje možnosti štúdia reparačných mechanizmov fotoautotrofných organizmov a umožňuje extrapolovať získané výsledky aj na vyššie rastliny. Navyše, prítomnosť troch genetických systémov umožňuje sledovať opravu DNA v jadre, chloroplastoch a mitochondriách a ich vzájomné prepojenie.

Cieľom tejto práce bolo prispieť k štúdiu opravných mechanizmov *C. reinhardtii* pomocou molekulárnej, mutačnej a genetickej analýzy UV-citlivých mutantov izolovaných na Katedre genetiky PvF UK.

Prvú informáciu o reparačne-deficitných mutantoch poskytuje porovnanie ich kriviek prežívania s prežívaním buniek štandardného kmeňa, prípadne porovnanie kriviek prežívania týchto kmeňov po pôsobení rôznych mutagénov, či už fyzikálnych (X-žiarenie, UV-žiarenie) alebo chemických (MNNG). Prežívanie buniek závisí od ich citlivosti k danému agensu.

Reparačne-deficitné mutanty rias *C. reinhardtii* boli izolované na základe citlivosti k UV-žiareniu. Analýzou kriviek dávka-efekt boli rozdelené do dvoch skupín – veľmi citlivé k UV-žiareniu (predpokladané poškodenie excízneho reparačného systému) a stredne citlivé k tomuto mutagénu (porucha iných reparačných dráh) (Podstavková et al., 1994).

Táto práca dopĺňa fenotypovú charakteristiku reparačných mutantov sledovaním vzťahov dávka-efekt po ovplyvnení alkylačnou látkou MNNG a X-žiarením.

Z porovnania kriviek prežívania po pôsobení MNNG vyplýva, že všetky testované kmene sú citlivejšie v porovnaní so štandardným typom, čo naznačuje, že tieto kmene majú zníženú schopnosť odstraňovať poruchy spôsobené chemomutagénmi typu MNNG. Aj medzi jednotlivými mutantami boli zistené rozdiely v citlivosti. Ako najcitlivejší sa javil kmeň *uvs15*, s predpokladanou poruchou mutagénneho reparačného mechanizmu, a kmeň *uvsE1*, pri ktorom bola zistená porucha v rekombinačnej oprave (Rosen a Ebersold, 1972). Kmene *uvs9*, s poruchou excíznej opravy, a *uvs13*, s doteraz nedefinovanou poruchou reparačného mechanizmu, boli citlivejšie ako štandardný kmeň,

ale zároveň menej citlivé ako kmene *uvsE1* a *uvs15*. Pri kmeni *uvs13* sa citlivosť prejavila až pri dávke 200 µg/ml.

Pri hodnotení mutability po pôsobení MNNG sme zistili opačný jav v porovnaní so zisteniami získanými pri *S. cerevisiae*, pri ktorých pri excíznych kmeňoch po pôsobení alkylačných látok zvyčajne dochádza k zvýšeniu frekvencie výskytu mutácií (Haynes a Kunz, 1981). Excízna oprava je pri kvasinkách error-free, t.j. presná a jej porucha teda navodzuje zvýšenú mutabilitu. V prípade excízne-deficitných kmeňov *C. reinhardtii* (*uvs9* a *uvs15*) došlo k zníženému výskytu mutácií v porovnaní so štandardným kmeňom, čo by mohlo znamenať, že pri riasach excízna oprava nie je presná. Toto tvrdenie by však bolo potrebné doplniť o ďalšie experimentálne dôkazy.

Pri riasach ešte nie je definovaný mechanizmus, ktorý by sa podieľal na oprave poškodení vyvolaných alkylačnými látkami. Doteraz sa nepodarilo dokázať prítomnosť alkyltransferázy, ktorá odstraňuje tieto poškodenia napr. pri *E. coli* (Xiao et al., 1991; Ito et al., 1994). Na základe porovnania výsledkov získaných sledovaním prežívania po pôsobení UV žiarenia a MNNG, možno predpokladať, že zatiaľ čo na oprave porúch spôsobených UV-žiarením sa podieľa excízny reparačný mechanizmus, o čom svedčí vysoká citlivosť kmeňa *uvs9* (Podstavková et al., 1991), na oprave porúch spôsobených chemomutagénmi typu MNNG bude mať pravdepodobne dôležitejšiu úlohu iný opravný systém, resp. systémy.

Zistilo sa, že kvasinky *S. cerevisiae* sú schopné opravy poškodení indukovaných MNNG pomocou bezchybnej rekombinačnej reparačnej dráhy, ktorá opravuje potenciálne letálne poškodenia spôsobené ionizačným žiarením (Mitchel a Morrison, 1982). Je tiež známe, že zvýšená rezistencia voči ionizačnému žiareniu, ktorá je spôsobená zvýšenou rekombinačnou schopnosťou, je pri kvasinkách spojená s redukciou frekvencie mutácií vzniknutých po ovplyvnení MNNG (Boreham a Mitchel, 1993). Pri *C. reinhardtii* nevedlo predovplyvnenie γ žiarením nasledované ovplyvnením MNNG k redukcii mutácií spôsobených MNNG. Znamenalo by to, že pri *C. reinhardtii* nie sú poškodenia indukované MNNG opravované pomocou rekombinačnej opravy alebo pri riasach nie je zvýšená rezistencia voči žiareniu výsledkom rekombinačnej opravy a existuje tu iný systém na opravu dvojreťazcových zlomov (Boreham a Mitchel, 1993). Boreham a Mitchel (1993) predpokladajú prítomnosť unikátneho mechanizmu na opravu

dvojvláknových zlomov v haploidných bunkách, pri ktorom by dochádzalo ku kooperácii jadrového a chloroplastového genómu.

Výsledky získané v tejto práci naznačili vysokú citlivosť kmeňa s poruchou rekombinačnej reparácie, čo by znamenalo, na rozdiel od výsledkov získaných vyššie uvedenými autormi, že pri riasach by mohol zohrávať dôležitú úlohu pri oprave poškodení spôsobených MNNG práve rekombinačný reparačný systém. Nemožno však vylúčiť ani spoluúčasť iného, ešte neopísaného reparačného systému, pretože aj pri kvasinkách a baktériách sa na oprave poškodení spôsobených alkylačnými látkami zúčastňujú viaceré reparačné dráhy (Friedberg et al., 1995). Dnes je už známe, že niektoré druhy poškodení môžu byť opravované viacerými mechanizmami – záleží to od rôznych faktorov. Kritickým krokom opravy je rozpoznanie poškodenia, kedy dochádza k interakciám proteínov, ktoré sa na nej podieľajú. Dôležitú úlohu tiež zohráva, v ktorej fáze bunkového cyklu sa bunka nachádza, či sa v čase poškodenia replikuje DNA alebo uskutočňuje transkripcia a či s nimi poškodenie interferuje, aké sú susedné sekvencie v blízkosti poškodenia, aké množstvo poškodenia je v DNA indukované, v akom fyziologickom stave sa bunka nachádza a podobne. Poukazuje na to aj genetický dôkaz prekrývania a kompetície viacerých opravných dráh pri odstraňovaní AP miest v kvasinkách *S. cerevisiae* (Swanson et al., 1999; Kuipers et al., 2000). Konštrukciou viacnásobných mutantov postupným vyradovaním bázovej excíznej opravy, nukleotidovej excíznej opravy, rekombinačnej opravy a syntézy cez poškodenie sa zistilo, že okrem BER, ktorá AP miesta opravuje pomocou AP endonukleáz, sú AP miesta opravované aj pomocou NER a tolerované rekombinačnou opravou a syntézou cez poškodenie. Iným príkladom je oprava cyklobutánových pyrimidínových dimérov v ľudských bunkách. Zistilo sa, že na ich oprave sa podieľa okrem NER aj “mismatch” oprava a interakcie medzi ich komponentami už boli dokázané in vitro (Bertrand et al., 1998).

Nemenej zaujímavé výsledky sme získali aj pri hodnotení vplyvu X-žiarenia. V súvislosti s aplikáciou X-žiarenia na riasu *C. reinhardtii* však musíme brať do úvahy niekoľko faktorov, ktoré ovplyvňujú prežívanie kmeňov. V prvom rade ide o fakt, že sme nemohli aplikovať X-žiarenie na kultúru naočkovanú na pevnom médiu. Vzhľadom na rozsah a podmienky experimentu sme museli kultúry ovplyvňovať v tekutom médiu.

Navyše, kultúry sme po ožiarení nemohli priamo očkovať na pevné médium. Tieto podmienky experimentu mohli do istej miery ovplyvniť prežívanie jednotlivých kmeňov. V literatúre bol opísaný tzv. LHR efekt (“liquid holding recovery”). Pri *E. coli*, ak boli bunky po UV ožiarení ponechané v tekutom médiu, vykazovali lepšie prežívanie (Tang a Smith, 1981). Podobný efekt opísali aj Frankenberg-Schwager a kol. pri kvasinkách *S. cerevisiae* (Frankenberg-Schwager et al., 1987). Bunky, ktoré boli vysievané ihneď po ožiarení X-žiarením, vykazovali nižšie prežívanie v porovnaní s bunkami, ktoré boli určitý čas udržiavané v podmienkach nevhodných pre rast (vo vode) a až potom vysievané na pevné médium. Zistilo sa, že zvýšenie prežívania buniek vysievaných neskôr po ožiarení je sprevádzané stratou dvojreťazcových zlomov (DSB) z DNA týchto buniek (Frankenberg-Schwager et al., 1980). Predpokladá sa teda, že práve oprava DSB vedie k zvýšenému prežívaniu pri bunkách vysievaných neskôr po ožiarení. Aby sme do istej miery redukovali LHR efekt, kultúry sme po ožiarení udržiavali v chlade až do vysievania na pevné médium v laboratóriu.

Ďalším faktorom ovplyvňujúcim prežívanie kmeňov *C. reinhardtii* po pôsobení X-žiarenia je čas, za ktorý je daná dávka aplikovaná. Pri dlhšej aplikácii určitej dávky sa zvýši prežívanie v porovnaní s kratšou aplikáciou tej istej dávky (Davis a Thorburn, 1968). V tejto súvislosti vzniká aj problém porovnávania výsledkov získaných rôznymi autormi, keďže v práci sa často nachádza len údaj o dávke, nie však čase, počas ktorého bola aplikovaná.

Napriek týmto problémom je na základe našich výsledkov isté, že najcitlivejšími kmeňmi sú kmene s poruchou rekombinačného reparačného mechanizmu a kmeň *uvs15* s predpokladanou poruchou mutagénnej opravy. Kmeň *uvs12*, s poruchou excízneho mechanizmu opravy DNA, bol menej citlivý k pôsobeniu X-žiarenia v porovnaní so štandardným kmeňom. Nízka citlivosť v porovnaní so štandardným kmeňom sa zistila aj pri excízne-deficitnom kmeni *uvs1* (Chankova et al., 1994), čo naznačuje, že tento systém opravy nezohráva významnú úlohu pri odstraňovaní poškodení spôsobených X-žiarením.

Pri kvasinkách *S. cerevisiae* sa štúdiom trojitých mutantov, s mutáciou génu z každej epistatickej skupiny, zistil významný podiel všetkých troch epistatických skupín na oprave poškodení indukovaných X-žiarením (Game, 2000). Takto sa získal ďalší

dôkaz o tom, že niektoré druhy poškodení môžu byť opravované viacerými reparačnými mechanizmami.

Na základe našich experimentov môžeme predpokladať, že pri riasach *C. reinhardtii* takisto dochádza k spolupráci, resp. súťaženiu viacerých reparačných mechanizmov pri oprave poškodení indukovaných MNNG alebo X-žiarením.

Získaním charakteristiky vybraných mutantov sa nám podarilo doplniť niektoré informácie o reparačných mechanizmoch pri fotoautotrofných organizmoch. Do roku 1997 nebol pri fotoautotrofných organizmoch izolovaný mutant s poruchou mutagénnej opravy ani mismatch korekcie. V tejto súvislosti sa ako zaujímavý javí kmeň *uvs14*, ktorý so zvýšenou spontánnou a indukovanou mutabilitou a rovnako aj rezistenciou k poškodeniu po pôsobení alkylačných látok, vykazuje typické znaky mutantov s narušenou "long patch mismatch" korekciou (Modrich, 1991). Nemenej zaujímavý je kmeň *uvs15*, ktorý nemutoval po UV a X-žiarení, veľmi málo po MNNG a patrí k najcitlivejším kmeňom po pôsobení všetkých testovaných mutagénov (Vlček 1997). Tento kmeň vykazuje podobnosť s *rad6* mutantom *S. cerevisiae* s rozhodujúcou úlohou v mutagénnej epistatickej skupine (Haynes a Kunz, 1981). Na rozdiel od *rad6*, pri *uvs15* je súčasne narušený aj excízny systém opravy. To je zaujímavý fakt, lebo mutanty s narušenou excíznou opravou majú pri kvasinkách obyčajne zvýšenú mutabilitu (Haynes a Kunz, 1981), pri riasach tomu tak však nie je. Genetická analýza potvrdila, že ide o poruchu v jednom géne, pri ktorom sa predpokladá, že má pleiotropný účinok alebo sprostredkuje prekrývanie funkcií medzi reparačnými cestami alebo interaguje s inými reparačnými proteínmi pri utváraní reparačných komplexov (Vlček et al., 1997). Takýto mutant ešte u heterotrofných organizmov nebol opísaný.

Najvhodnejšou metódou na zatriedenie reparačne-deficitných kmeňov do jednotlivých reparačných dráh je molekulárna analýza. Prvé pokusy o molekulárnu analýzu opravných systémov nezávislých na svetle pri riasach uskutočnili Swinton a Hanawalt (1973). Použili biochemickú analýzu UV žiarením indukovaných pyrimidínových dimérov pomocou ³²P značenej DNA. Využili poznatok, že fosfodiesterová väzba medzi pyrimidínovými dimérmi je rezistentná k fosfodiesterázam. Pomocou tejto metódy nepotvrdili prítomnosť excízie pyrimidínových dimérov u štandardného kmeňa v jadrovej ani chloroplastovej DNA (Swinton a Hanawalt, 1973).

Toto zistenie ich viedlo k záveru, že *C. reinhardtii* nemá excíznú reparačnú dráhu. V tom období navyše existoval názor, že fotoautotrofné eukaryoty vo všeobecnosti nemajú excízny systém opravy (Wolf a Cleaver, 1973).

Neúspech Swintona a Hanawalta spočíval v tom, že na značenie DNA použili rádioaktívne značený tymín. Neskôr sa však zistilo, že niektoré druhy rias nie sú schopné inkorporovať exogénny tymín alebo tymidín do DNA (Wanka et al., 1970 – cit. Vlčková a Vlček, 1984). Small a Greimann (1977a) neskôr modifikovali metodiku detekcie pyrimidínových dimérov a analýzy DNA po ožiarení. Použili značenie DNA pomocou rádioaktívne značeného adenínu a miesta pyrimidínových dimérov detekovali pomocou UV-špecifickej endonukleázy z *Micrococcus luteus*, ktorá je po detailnejšom preskúmaní svojej aktivity v súčasnosti označovaná ako UV-dimér špecifická glykozyláza/AP lyáza (*Mlu-pdgI*) (Lloyd, 1998). Týmto postupom dokázali prítomnosť excíznej opravy v jadrovom i chloroplastovom genóme štandardného kmeňa *C. reinhardtii* (Small a Greimann, 1977a,b).

Túto metódu sme použili pri analýze mutantných kmeňov izolovaných na Katedre genetiky PvF UK. Ako negatívnu kontrolu sme použili štandardný kmeň W1, ktorý nemá porušenie excíznu opravu. Pri tomto kmeni očividne došlo k odstráneniu pyrimidínových dimérov po 24-hodinovej kultivácii v tme, čo opätovne potvrdzuje už dokázaný fakt, že *C. reinhardtii* má funkčnú excíznú reparačnú dráhu. Ako pozitívnu kontrolu sme použili excízne defektný kmeň *uvs9*, pri ktorom ani po 24 hodinách nedochádza k obnoveniu vysokomolekulárnych frakcií a teda k vyštípeniu pyrimidínových dimérov.

Molekulárna analýza reparačne-deficitných kmeňov potvrdila poruchu vo vyštíepovaní pyrimidínových dimérov pri mutantoch *uvs12* a *uvs15*. Naopak pri kmeňoch *uvs13* a *uvs14* nebola zistená porucha vo vyštíepovaní pyrimidínových dimérov, čím sme potvrdili, že tieto mutanty nepatria do skupiny mutantov s poruchou excíznej reparačnej dráhy.

Metóda, ktorú sme použili na analýzu mutantov, je veľmi citlivým testom na stanovenie schopnosti buniek vyštíepovať pyrimidínové diméry a preto je vhodná na testovanie kmeňov. Vyžaduje si však opatrnú manipuláciu s izolovanou DNA (používanie zastrihnutých špičiek na automatických pipetách, opatrné pretrepávanie pri izolácii DNA atď.), aby nedošlo k jej mechanickému poškodeniu. V každom pokuse sme

preto robili aj variant bez UV endonukleázy, aby sme zistili, či sa izolovaná DNA počas manipulácie nepolámala, čo by skreslilo získané výsledky. Ďalšie skreslenie by mohla spôsobiť RNA s inkorporovaným ^3H -adenínom. Tento problém sme riešili spočiatku pridaním RNA-zy, neskôr sme RNA odstraňovali pomocou alkalickéj hydrolýzy, ktorá sa nám osvedčila.

Metóda, ktorú sme použili, je veľmi citlivá, avšak technicky veľmi náročná. V súčasnosti by ju mohla nahradiť jednoduchšia metóda pulznej gélovej elektroforézy (PFGE), ktorá je tiež vhodná na sledovanie prípadnej aktivity reparačných systémov (Kraxenberger et al., 1994). Aj my sme zvažovali použiť túto metódu pri analýze mutantných kmeňov. Doteraz však nebol vypracovaný vhodný protokol PFGE pre riasy *C. reinhardtii*. Hlavnými príčinami sú prítomnosť bunkovej steny na povrchu rias a niekoľkonásobne rozsiahlejší genóm v porovnaní s kvasinkami. Bunkovú stenu je možno v súčasnosti úspešne odstrániť pomocou gametického lytického enzýmu autolyzínu. Čo sa týka genómu, podľa súčasných poznatkov genóm *C. reinhardtii* pozostáva z približne 100 Mb usporiadaných v 17 väzbových skupinách (Lefebvre a Siflow, 1999). Pre náš experiment by však nebolo potrebné vizualizovať všetky chromozómy, stačí sledovať, či došlo k poštiepeniu a teda k zmene v oblastiach s nižšími molekulovými hmotnosťami. Z technického hľadiska je táto metóda oveľa výhodnejšia a pri dostupnosti aparatúry aj finančne menej náročná. Navyše by sa nemuselo používať rádioaktívne značenie DNA.

Genetická analýza je takisto jednou z metód, ktorá umožňuje upresniť informácie o vlastnej genetickej determinácii mutantného znaku a zaradiť reparačne-deficitných mutantov do jednotlivých reparačných dráh. Rekombinančné stanovenie alelizmu mutantov sme robili tetrádovou analýzou (Harris, 1989). Keďže priebeh životného cyklu je pri pohlavnom rozmnožovaní *C. reinhardtii* rovnaký ako pri kvasinkách *S. cerevisiae*, používa sa rovnaká technika ako pri kvasinkách. Vyštiepovanie štandardného typu po skrížení dvoch UV-citlivých mutantov znamená, že gény nie sú alelické. Naopak, ak pri krížení dvoch mutantných kmeňov nevyštiepuje štandardný typ, gény sú alelické alebo v silnej väzbe, kedy nemusí štandardný typ vyštiepovať ani v prípade, že gény nie sú alelické. Preto je potrebné v prípade, kedy nevyštiepuje štandardný typ, získaný údaj

doplniť o výsledky analýzy na úrovni zygót. Štandardný fenotyp potom dokazuje, že porucha opravy DNA mutantných kmeňov je spôsobená mutáciami v rôznych génoch.

V rámci genetickej analýzy sme určovali alelizmus mutantných kmeňov s predpokladanou poruchou excíznej reparačnej dráhy. Problémom pri tetradovej analýze bola slabá klíčivosť a životaschopnosť zygót a spór reparačne-deficitných mutantov s poruchou excíznej opravy a nízka párovacia schopnosť niektorých kmeňov. Na základe genetickej analýzy sme dokázali vyštiepovanie štandardného typu pri väčšine krížení, čo potvrdilo, že sledované gény nie sú alelické. V prípade krížení, pri ktorých sa nevyštiepil štandardný typ (*uvs1 x uvs371*, *uvs9 x uvs351*, *uvs12 x uvs15*), bolo potrebné získať údaj doplniť výsledkami analýzy na úrovni zygót. Pri krížení *uvs12 x uvs15* sme pomocou analýzy na úrovni zygót potvrdili obnovenie štandardného fenotypu diploida, čo znamenalo, že pri krížených kmeňoch ide o mutácie v rôznych génoch. Výnimkou boli kríženia *uvs1 x uvs371* a *uvs9 x uvs351*, pri ktorých sme ani pomocou analýzy na úrovni zygót nepotvrdili obnovenie štandardného fenotypu. Na základe získaných výsledkov môžeme uvažovať, že v tejto skupine mutantov ide o 4 samostatné gény určujúce citlivosť k UV žiareniu.

V zbierke reparačne-deficitných mutantov *C. reinhardtii* sa nachádzajú aj také kmene, ktoré na základe fenotypovej charakteristiky naznačili možné prepojenie medzi poškodením DNA a reguláciou bunkového cyklu. V ďalšej práci sme sa preto zamerali na štúdium tohto problému. Eukaryotické bunky odpovedajú na poškodenie DNA aktiváciou opravných mechanizmov DNA a zastavením bunkového cyklu v špecifických bodoch označovaných ako kontrolné body bunkového cyklu (tzv. „checkpoint“). Regulácia bunkového cyklu v závislosti od poškodenia DNA sa v súčasnosti dostáva do popredia záujmu, lebo sa predpokladá, že aj poruchy tohto procesu navodzujú akumuláciu nežiadúcich zmien DNA a prispievajú tým k zvýšenej pravdepodobnosti vzniku nádorových ochorení. O dôležitosti štúdia regulácie bunkového cyklu svedčí aj fakt, že v roku 2001 bola udelená Nobelova cena za medicínu trom vedcom zaoberajúcim sa práve touto problematikou.

Dnes je už známe, že veľa génov s kľúčovou úlohou v reparácii DNA má pleiotropný účinok a kontroluje prepojenie viacerých dôležitých bunkových procesov. Reparácia DNA je závislá od typu poškodenia a fázy bunkového cyklu, v ktorom sa

bunka nachádza. Jedným z najzávažnejších poškodení DNA sú dvojreťazcové zlomy (DSB). DSB predstavujú potenciálne letálne riziko, ktoré môže byť indukované ionizujúcim žiarením, rádiomimetikujúcimi chemikáliami (napr. MMS), voľnými radikálmi vznikajúcimi počas bunkového metabolizmu alebo niektorými chemoterapeutikami (napr. bleomycínom). DSB však môžu vznikať aj v rámci prirodzených bunkových procesov, akými sú napríklad miestne-špecifická rekombinácia alebo replikácia na poškodenom templaté. Pre bunku je nesmierne dôležité, aby rozpoznala a opravila DSB, pretože neopravené alebo nepresne opravené DSB môžu viesť k translokáciám a fragmentáciám chromozómov, deléciám a v konečnom dôsledku k inaktivácii kľúčových génov a následne k možnej bunkovej smrti alebo rakovine (Pastink et al., 2001). G2 fáza bunkového cyklu je dôležitá pre opravu takýchto poškodení vzhľadom na to, že postreplikačná reparácia prebieha väčšinou rekombinačným mechanizmom, ktorý vyžaduje homologické reťazce. Po replikácii je DNA informácia zdvojená, čo dovoľuje, aby sa spomínaný rekombinačný mechanizmus uskutočnil aj v haploidných bunkách. Pri kvasinkách *S. cerevisiae* je esenciálny pre zastavenie bunkového cyklu v G2 fáze *RAD9* gén. Dôležitá funkcia spomínaného génu naznačuje jeho pravdepodobnú evolučnú konzervovanosť, ktorá bola dokázaná u viacerých génov s regulačnou funkciou alebo pleiotrofným účinkom. *RAD9* gén *S. cerevisiae* je pomerne dobre preštudovaný a tiež je známy fenotyp *rad9* mutantov, ktorý je veľmi charakteristický práve po poškodení DNA ionizujúcim žiarením. Keďže bunky *rad9* majú mutáciu v géne, ktorý je zodpovedný za zastavenie bunkového cyklu, po poškodení DNA prechádzajú do mitotického delenia bez zastavenia, ktoré je potrebné na jej reparáciu, genetická informácia nie je celistvá a bunky po niekoľkých deleniach odumierajú. Výsledkom je tvorba mikrokolónií, ktoré obsahujú len niekoľko buniek podľa závažnosti poškodenia (Weinert a Hartwell, 1988).

Pri riasach *C. reinhardtii* sa podarilo izolovať mutanta, označeného *uvs11*, pri ktorom sa v porovnaní so štandardným typom zistila zvýšená citlivosť na UV-žiarenie, MNNG a takisto aj zvýšená frekvencia priamych mutácií vedúcich k rezistencii na streptomycín (Vlček et al., 1987; Miadoková et al., 1994). Pri mikroskopickom hodnotení letálneho účinku UV-žiarenia vykazoval kmeň *uvs11* významné zvýšenie frekvencie buniek odumierajúcich po jednom alebo viacerých deleniach v porovnaní so štandardným

typom alebo inými UV-citlivými kmeňmi (Vlček et al., 1987). Podstata poruchy mutácie *uvs11* zatiaľ nie je známa, avšak na základe doterajších výsledkov (fenotypový prejav po pôsobení UV-žiarenia a MNNG, tvorba mikrokolónii) môžeme predpokladať jej podobnosť s *rad9* mutáciou v kvasinkách *S. cerevisiae*.

Keďže v literatúre je málo zmienok o porovnaní základných bunkových procesov medzi heterotrofnými a fotoautotrofnými mikroorganizmami, cieľom našej práce bolo práve hľadanie možných spoločných znakov medzi spomenutými mutantami. Neprítomnosť *Rad9* proteínu možno nahradiť pridaním mikrotubulového jedu MBC, ktorý spôsobuje reverzibilné zablokovanie bunkového cyklu v G2 fáze a tým poskytne bunke čas na opravu prípadných poškodení DNA pred jej vstupom do mitózy (Weinert a Hartwell, 1988).

Na zastavenie bunkového cyklu pomocou MBC pri riasach *C. reinhardtii* sme vzhľadom na dlhšiu dobu trvania bunkového cyklu (24 hodín) oproti kvasinkám museli modifikovať metodiku ovplyvnenia MBC. Pri riasach sme používali trojnásobne vyššiu koncentráciu MBC, ktorý sme nechali pôsobiť 12 – 14 hodín pred samotným ovplyvňovaním. Pri *S. cerevisiae* MBC zastavuje bunkový cyklus v neskorej G2 fáze, tesne pred vstupom do mitózy. G2 fáza *C. reinhardtii* je súčasťou rastovej fázy, ktorá predchádza replikáciu a je závislá od svetla ako hlavného zdroja energie (Šetlík a Zachleder, 1981). Na základe našich pozorovaní sme určili časový interval pre efektívnu aplikáciu MBC medzi 6 až 8 hodinou svetelnej periódy, pri svetelnom režime 12:12. V tomto období bunka riasy prechádza sériou indukčných bodov a rozhoduje sa o nasledujúcich deleniach (Šetlík a Zachleder, 1981). Neskoršie pridanie MBC už nezabránilo mitóze, o čom svedčí aj prítomnosť viacjadrových buniek pri fluorescenčnej mikroskopii.

V našich experimentoch sme pozorovali zvýšenú citlivosť oboch sledovaných mutantov po pôsobení UV, X-žiarenia aj MMS. Zastavenie bunkového cyklu pomocou MBC viedlo k zlepšeniu prežívania pri oboch mutantoch, pričom pri mutantnom kmeni *uvs11* sa prežívanie zlepšilo až na úroveň štandardného typu po pôsobení UV aj X-žiarenia. Nižšia citlivosť riasových kmeňov k UV-žiareniu, v porovnaní s kvasinkami, je vysvetliteľná fotoautotrofným spôsobom života, kde poškodenie UV svetlom musí byť opraviteľné celou škálou reparačných dráh. Zvýšené prežívanie po pôsobení UV pri

mutantovi *uvs11* v porovnaní s výsledkami získanými Vlčkom (Vlček et al., 1986) bolo spôsobené odlišnými podmienkami pokusu. V dôsledku aplikácie MBC sme kultúry ožarovali v tekutom médiu, kedy sa prejavuje už vyššie spomínaný LHR efekt, ktorý vedie k zlepšeniu prežívania.

Prežívanie *uvs11* mutanta, so zablokovaným bunkovým cyklom pomocou MBC, sa zlepšilo aj po pôsobení MMS, avšak nevrátilo sa až na úroveň štandardného kmeňa ako tomu bolo pri UV a X-žiarení.

Pri kvasinkách sa v prípade UV a X-žiarenia čiastočne zlepšilo prežívanie *rad9* mutanta ovplyvneného MBC, nikdy však nedosiahlo úroveň štandardného kmeňa. Na rozdiel od *uvs11* mutanta *C. reinhardtii*, po ovplyvnení MMS *rad9* nereagoval na zastavenie bunkového cyklu, t.j. prežívanie sa vôbec nezmenilo v porovnaní s variantom *rad9* bez ovplyvnenia MBC. Tieto rozdiely poukazujú na odlišnú reparačnú stratégiu heterotrofných a fotoautotrofných mikroorganizmov pri oprave poškodení DNA spôsobených MMS. MMS ako alkylačná látka indukuje široké spektrum DNA poškodení, ktoré môžu byť rozpoznané viacerými reparačnými dráhami, ktoré pôsobia v rozličných štádiách bunkového cyklu. Je preto možné, že 1-hodinové zastavenie bunkového cyklu po ovplyvnení buniek MMS nepostačuje na efektívnu opravu MMS indukovaných poškodení.

MBC po zastavení bunkového cyklu poskytne čas pre opravu DNA, ktorá je znemožnená pri poruche bunkového cyklu, čo sa potvrdilo aj pri mikroskopickom pozorovaní buniek po ovplyvnení ionizujúcim žiarením. Pri riasach *C. reinhardtii* je ukazujúcim znakom v tomto prípade pomer množstva buniek odumretých pred delením a po delení bunky. Mikrokolónie mŕtvych buniek sú pri *C. reinhardtii* veľmi dobre hodnotiteľné svetelným mikroskopom. Bunky *uvs11* mutanta vytvárajú mikrokolónie po ovplyvnení UV, X-žiarením aj MMS s oveľa vyššou frekvenciou ako bunky štandardného kmeňa. Po ovplyvnení MBC sa podiel buniek odumierajúcich po delení pri mutantnom kmeni *uvs11* rádovo znížil, rovnako ako pri *rad9* kmeni *S. cerevisiae* (Weinert a Hartwell, 1988; Weinert a Hartwell, 1990).

Z našich výsledkov vyplýva, že pri oboch študovaných mutantoch zastavenie bunkového cyklu poskytne čas na opravu DNA. Tieto výsledky potvrdzujú nevyhnutnosť zablokovania bunkového cyklu pre kompletnú a efektívnu opravu poškodení DNA, ako aj

predpokladanú prítomnosť kontrolného bodu u rias, ktorý by bol analogický G2-fáznemu bodu pri *S. cerevisiae*. Zastavenie bunkového cyklu pomocou MBC však nekomplementuje pravdepodobnú regulačnú funkciu týchto génov.

Z prezentovaných výsledkov je možné predpokladať analógiu *UVS11* génu *C. reinhardtii* s kvasinkovým *RAD9* génom. Správnosť našich predpokladov môžeme overiť, resp. vyvrátiť, komplementáciou defektu *Uvs11* mutanta funkčným *RAD9* génom. Nevyhnutnou podmienkou je však zavedenie metódy pre úspešnú transformáciu jadrového genómu pri *C. reinhardtii*. Transformačná technika je v súčasnosti bežne využívaná v takmer každom genetickom a molekulárnom výskume a na rôznych modelových organizmoch, od baktérií až po eukaryotické rastlinné a živočíšne druhy.

Doteraz boli vyvinuté tri rôzne metódy na transformáciu *C. reinhardtii* – bombardovanie buniek wolfrámovými partikulami, elektroporácia a transformácia pomocou sklenených guľičiek a polyetylénglykolu (PEG). Keďže prvé dve spomínané metódy vyžadujú špeciálne (finančne nákladné) technické vybavenie, rozhodli sme sa na zavedenie DNA do buniek *C. reinhardtii* využiť metódu využívajúcu sklenené guľičky a PEG.

Úspešnosť transformačných pokusov *C. reinhardtii* súvisí s výberom vhodného selekčného markera. Využívajú sa gény s ľahko selektovateľným fenotypom, jednoznačne odlišiteľným od netransformovaných buniek. Pre našu prácu sme si vybrali gén ARG7.8, kódujúci arginínsukcinát lyázu. Výhoda tohto markera spočíva v jednoduchej selekcii transformantov na minimálnom médiu a v extrémnej stabilite mutácie *arg7* v auxotrofných mutantoch *C. reinhardtii*, s doteraz nedetekovanou spontánnou reverziou (Gumpel et al., 1994). Z Oddelenia molekulárnej biológie Univerzity v Ženeve sme získali bakteriálny kmeň, ktorý obsahoval plazmid nesúci ARG7 gén *C. reinhardtii* a taktiež príslušného mutanta *C. reinhardtii*, ktorého defekt je komplementovaný génom nachádzajúcim sa na plazmide.

Nami zvolená metóda si vyžaduje prácu s bunkami bez bunkovej steny. Neprítomnosť bunkovej steny možno zabezpečiť dvoma spôsobmi – použitím genetického mutanta alebo odstránením bunkovej steny pomocou gametického lytického enzýmu autolyzínu. V prvom prípade ide o kmeň *cw15*, ktorému chýba centrálny triplet – vrsty V2 až V6 bunkovej steny (Harris, 1989). Nevýhodou tohto kmeňa je, že je častejšie

napádaný bakteriálnou infekciou a jeho rast je spomalený oproti iným kmeňom. Na dosiahnutie logaritmickej fázy rast, potrebnej pre úspešnosť transformácie, sme museli predĺžiť kultiváciu až na 4 dni oproti 3 dňom pri štandardnom kmeni a iných mutantoch s bunkovou stenou. Pri kmeňoch s intaktnou bunkovou stenou (v našom prípade *cc51*, ktorý nesie *arg7* mutáciu) sme bunkovú stenu natrávili autolyzínom a ihneď transformovali. Izolácia a použitie autolyzínu je veľmi jednoduché a pritom účinné. Možno ho použiť aj pri iných metódach, ktoré tiež vyžadujú odstránenie pevnej bunkovej steny rias, napr. pri metóde pulznej gélovej elektroforézy.

S takto pripravenými kmeňmi (bez bunkovej steny) sa nám podarilo uskutočniť transformáciu jadrového genómu jednobunkovej zelenej riasy *C. reinhardtii*. Zistili sme, že na účinnosť transformácie vplyva viacero parametrov: čistota plazmidovej DNA, koncentrácia a molekulová hmotnosť polyetylén glykolu, genotyp recipientného kmeňa, čas ovplyvnenia.

Mechanizmus účinku polyetylén glykolu doteraz nie je vysvetlený. Dunahay zistil, že úplná absencia polyetylén glykolu spôsobuje pokles prežívania o 80 – 90 % oproti kontrole (Dunahay, 1993). Na efektivitu transformácie vplývala nielen koncentrácia PEG-u, ale aj jeho molekulová hmotnosť, pričom najvyšší počet transformantov sme získali pri použití PEG-u s molekulovou hmotnosťou 8000.

Významným faktorom, ktorý ovplyvňoval efektivitu koncentrácie, bola čistota použitej pDNA. V experimentoch sme pracovali s tromi variantami. Prvý variant sme získali od Prof. Rochaixa z Univerzity v Ženeve. Ďalšie dva varianty sme izolovali z bakteriálneho kmeňa *E. coli XLI-Blue* a navzájom sa líšili spôsobom izolácie, jeden bol izolovaný pomocou komerčného kitu „High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Boehringer Mannheim) a druhý sme izolovali metódou podľa Maniatis et al. (1982). Najlepšie výsledky sme, podľa očakávania, získali pri použití pDNA izolovanej pomocou komerčného kitu, naopak najslabšie s použitím pDNA izolovanej klasickým spôsobom podľa Maniatis et al. (1982).

Naše experimenty boli zamerané na zavedenie úspešnej transformačnej metódy, aby sme mohli pokračovať v detailnejšom štúdiu reparačne-deficitných mutantov. Preto sme sa sústredili len na jednoduché nepriame dôkazy selekcie transformantov. Potenciálne transformanty sme preniesli na nové selektívne médium bez arginínu,

na ktorom opäť vyrástli všetky preočkované kolónie. Rovnaké nepriame dôkazy použili vo svojej práci aj Mayfiel a Kindle (1989). V budúcnosti, pri konkrétnom použití transformačnej metódy pri štúdiu reparačných mutantov, bude potrebné transformanty podrobiť detailnej molekulárnej analýze (napr. PCR), aby sme overili prítomnosť vnášanej sekvencie.

V súčasnosti je pri riasach pripravený dvojité mutant *uvs11 arg7.8*. Tento kmeň bude možné použiť na komplementáciu *uvs11* mutácie *RAD9* génom. Existencia genómovej a cDNA knižnice by tiež umožnila izolovať nielen *UVS11*, ale aj ďalšie gény pomocou komplementácie jednotlivých mutantných fenotypov. V súčasnosti sú k dispozícii genómove knižnice v kozmidoch a kvasinkových umelých chromozómoch (YAC), cDNA knižnica v λ fágu a tzv. indexová kozmidová knižnica (Purton a Rochaix, 1994; Zhang et al., 1994; Infante et al., 1995). Podmienkou však zostáva vysoká transformačná účinnosť, ktorá sa pri riasach *C. reinhardtii* od počiatku výskumov v tejto oblasti zvýšila, ale stále nedosahuje úroveň frekvencie transformácie u iných organizmov (napr. *E.coli* a kvasiniek). Je preto potrebné pokračovať v intenzívnom výskume v tejto oblasti.

Štúdium v oblasti reparačných mechanizmov DNA pri jednobunkovej zelenej riase *C. reinhardtii* neustále napreduje. Niektoré gény zapojené do opravy DNA boli na základe klasických genetických metód mapované a charakterizované. Pomocou metód molekulárnej biológie aplikovaných na tento modelový organizmus bude v budúcnosti možné zistiť produkty týchto génov a taktiež ich presnú funkciu v procese opravy DNA.

Pevne veríme, že aj táto práca prispela k rozšíreniu poznatkov o reparačných mechanizmoch *C. reinhardtii*.

Kapitola 7

Závery

- Porovnaním prežívania testovaných mutantov a štandardného kmeňa po pôsobení MNNG sme zistili, že všetky testované reparačne-deficitné kmene sú citlivejšie na pôsobenie MNNG v porovnaní so štandardným kmeňom.
- Zvýšená citlivosť k MNNG pri mutantovi *uvrE1* s poruchou rekombinačnej reparačnej dráhy naznačila, že rekombinačný reparačný mechanizmus hrá úlohu pri oprave porúch spôsobených týmto alkylačným agensom.
- Pri kmeňoch *uvr9* a *uvr15*, s poruchou excíznej opravy, sme zistili zníženú frekvenciu mutácií vedúcich k streptomycínovej rezistencii indukovaných MNNG v porovnaní so štandardným kmeňom. Pozorované zníženie mutability týchto kmeňov naznačuje čiastočnú odlišnosť vo vzťahu k presnosti opravy po pôsobení MNNG medzi fotoautotrofnými a heterotrofnými organizmami.
- Porovnaním prežívania testovaných mutantov a štandardného kmeňa po pôsobení X-žiarenia sme zistili, že väčšina testovaných reparačne-deficitných mutantov je citlivejšia na pôsobenie X-žiarenia ako štandardný kmeň. Výnimku tvorí len kmeň *uvr12* s poruchou excíznej reparačnej dráhy.
- Znížené prežívanie a zvýšené frekvencie mutácií po pôsobení X-žiarenia oproti štandardnému kmeňu pri kmeňoch *uvrE1* a *uvr10* naznačuje, že pri riasach *C. reinhardtii* hrá rekombinačná reparačná dráha dôležitú úlohu pri odstraňovaní poškodenia indukovaného X-žiarením a že táto reparačná dráha je presná (error-free).

- Kmeň *uvs14*, pri ktorom sme zistili zvýšenú spontánnu aj indukovanú mutabilitu po X-žiarení, vykazuje znaky mutantov s narušenou „mismatch” korekciou.
- Kmeň *uvs15* patrí k najcitlivejším testovaným kmeňom, s veľmi nízkou (po pôsobení MNNG) alebo žiadnou (po pôsobení X-žiarenia) indukovanou mutabilitou. Tento kmeň vykazuje podobnosť s *rad6* mutantom *S. cerevisiae* s rozhodujúcou úlohou v mutagénnej epistatickej skupine.
- Molekulárna analýza potvrdila poruchu vo vyštiepovaní pyrimidínových dimérov pri kmeňoch *uvs15* a *uvs12*, čo znamená, že ide o mutantov s poruchou excíznej opravy.
- Pri kmeňoch *uvs13* a *uvs14* nebola potvrdená porucha vo vyštiepovaní pyrimidínových dimérov. Tým sme získali dôkaz, že mutantné kmene *uvs13* a *uvs14* nepatria do excíznej reparačnej dráhy.
- Výsledky molekulárnej a mutačnej analýzy naznačili, že pri kmeni *uvs15* by mohlo ísť o mutáciu v géne s pleiotrofným účinkom.
- Z výsledkov genetickej analýzy vyplýva, že v rámci skupiny analyzovaných mutantov ide pravdepodobne o 4 rôzne gény určujúce citlivosť k UV žiareniu.
- Stanovili sme vhodnú koncentráciu a čas na účinnú aplikáciu mikrotubulového inhibítora MBC (metylbenzimidazol 2-yl karbamátu) počas bunkového cyklu riasy *C. reinhardtii*.
- Dokázali sme zvýšenú citlivosť *uvs11* mutantu *C. reinhardtii* a potvrdili sme zvýšenú citlivosť *rad9* mutantu *S. cerevisiae* popri UV- aj na pôsobenie X- žiarenia a alkylačnej látky MMS (metylmétánsulfonát).
- Potvrdili sme, že zastavenie bunkového cyklu pomocou MBC vedie k zvýšeniu prežívania pri *rad9* mutantovi kvasiniek *S. cerevisiae* a dokázali sme, že zastavenie bunkového cyklu pomocou MBC takisto vedie k zvýšeniu prežívania aj pri *uvs11* mutantovi riasy *C. reinhardtii* po pôsobení UV, X-žiarenia a MMS.
- Na základe kvantitatívneho určenia pomeru buniek odumierajúcich pred delením a po rozdelení pri *C. reinhardtii* sme dokázali, že zastavenie bunkového cyklu pomocou MBC vedie, analogicky s kvasinkami, k zníženiu počtu mikrokolónii,

- Izolovali sme gametický enzým autolyzín z buniek rias *C. reinhardtii* a potvrdili jeho degradačný účinok na bunkovú stenu.
- Uskutočnili sme transformáciu jadrového genómu dvojitého mutanta *arg7cw15 C. reinhardtii* plazmidom pARG7.8 nesúcim funkčný gén pre arginínsukcinátlyázu metódou využívajúcou sklené guľičky a PEG. Dosiahli sme účinnosť transformácie v rozmedzí $0,35 \times 10^{-6}$ až $15,9 \times 10^{-6}$ /bunku.
- Uskutočnili sme transformáciu jadrového genómu mutanta *cc51 C. reinhardtii* plazmidom pARG7.8 metódou využívajúcou sklené guľičky a PEG. Dosiahli sme účinnosť transformácie v rozmedzí $0,12 \times 10^{-6}$ až $1,16 \times 10^{-6}$ /bunku.
- Zistili sme, že na účinnosť transformácie vplýva viacero parametrov: čistota plazmidovej DNA, koncentrácia a molekulová hmotnosť polyetylénglykolu, genotyp recipientného kmeňa, čas ovplyvnenia.

Literatúra

- ABOUSSEKHRA, A., VIALARD, J.E., MORRISON, D.E., RORRE-RUIZ M.A., ČERNÁKOVÁ, L., FABRE, P., LOWNDES, N.F.: A novel role for budding yeast RAD9 checkpoint gene in DNA damage-dependent transcription. *EMBO J.*, 15, 1996, 3912-3922.
- ADAMS, D.E., TSANEVA, I.R., WEST, S.C.: Dissociation of *RecA* filaments from duplex DNA by the *RuvA* and *RuvB* DNA repair proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1994, 9901-9905.
- AHMAD, M., CASHMORE, A.R.: HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366 (6451), 1993, 110-111.
- ALLEN, D.J., MAKHOV, A., GRILEY, M., TAYLOR, J., THRESHER, R.: MutS mediates heteroduplex loop formation by translocation mechanism. *EMBO J.*, 14, 1997, 4467-4476.
- ANDREWS, J., MARTIN-BERTRAM, H., HAGEN, U.: S1 nuclease-sensitive sites in yeast DNA: an assay for radiation-induced base damage. *Int. J. Radiat. Biol.*, 45, 1984, 497-504.
- AUCHINCLOSS, A.H., LOROCH, A.I., ROCHAIX, J.-D.: The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: cloning of the cDNA and its characterization as a selectable shuttle marker. *Mol. Gen. Genet.*, 261, 1999, 21 – 30.
- BAER, M., SANCAR, G.H.: Photolyases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* recognize common binding determinants in DNA containing pyrimidine dimers. *Mol. Cell. Biol.*, 9, 1989, p. 4777.
- BAILLY, V., LAMB, J., SUNG, P., PRAKASH, S., PRAKASH, L.: Specific complex formation between yeast *RAD6* and *RAD18* proteins: a potential for targeting *RAD6* ubiquitin conjugating activity to DNA damage sites. *Genes Dev.*, 8, 1994, 811-820.

- BAILLY, V., LAUDER, S., PRAKASH, S., PRAKASH, L.: Yeast DNA repair proteins *RAD6* and *RAD18* form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J. Biol. Chem.*, 272, 1997, 23360-23365.
- BAILLY, V., SOMMERS, C.H., SUNG, P., PRAKASH, L., PRAKASH, S.: Specific complex formation between proteins encoded by the yeast DNA repair and recombination genes *RAD1* and *RAD10*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1992, 8273-8277
- BARRAS, F., MARINUS, M.G.: The great GATC: DNA methylation in *E. coli*. *Trends Genet.*, 5, 1989, 139-143.
- BARDWELL, L., COOPER, A.J., FRIEDBERG, E.C.: Stable and specific association between the yeast recombination and DNA repair proteins *RAD1* and *RAD10* in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, 12, 1992, 3041-3049.
- BARDWELL, A.J., BARDWELL, L., TOMKINSON, A.E., FRIEDBERG, E.C.: Specific cleavage of model recombination and repair intermediates by the yeast *Rad1-Rad10* endonuclease. *Science*, 265, 1994, 2082-2085.
- BEARD, W.A., WILSON, S.H.: Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase β . *Mutat. Res.*, 460, 2000, 231-244.
- BENNETT, R.A.O., WILSON III, D.M., WONG, D., DEMPLE, B.: Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase β in the base excision repair pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 1997, 7166-7169.
- BERTRAND, P., TISHKOFF, D.X., FILOSI, N., DASGUPTA, R., KOLODNER, R.D.: Physical interaction between components of DNA mismatch repair and nucleotide excision repair. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95, 1998, 14278-14283.
- BEUKERS, R., BERENDS, W.: Isolation and identification of the irradiation product of thymine. *Biochim. Biophys. Acta*, 41, 1960, 550-551.
- BLANKENSHIP, J.E., KINDLE, K.L.: Expression of chimeric genes by the light-regulated *cabII-1* promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*: a *cabII-1/nit1* gene functions as a dominant selectable marker in a *nit1⁻ nit2⁻* strain. *Mol. Cell. Biol.*, 12, 1992, 5268 - 5279.
- BOHR, V.A., SMITH, C.A., OKUMOTO, D.S., HANAWALT, P.C.: DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, 40, 1985, 359-369.
- BOREHAM, D. R., MITCHEL, R. E. J.: DNA repair in *Chlamydomonas reinhardtii* induced by heat-shock and gamma radiation. *Radiation Res.*, 135, 1993, 365-371.

- BOYNTON, J.E, HARRIS, E.H., BURKHART, B.D., LAMERSON, P.M., GILLHAM, N.W.: Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1987, 2391-2395.
- BOYNTON, J.E, GILLHAM, N.W., HARRIS, E.H., HOSLER, J.P., JOHNSON, A.M.: Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. Science, 24, 1988, 1534-1538.
- BRIDGES, B.A.: The role of DNA damage in stationary phase 'adaptive' mutation. Mutation Res., 408, 1998, 1-9.
- BRIDGES, B.: The two-step model for translesion synthesis: then and now. Mutat. Res., 485, 2001, 61-67.
- BRITT, A.B.: DNA damage and repair in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 47, 1996, 75-100.
- BROOMFIELD, S., HRYCIW, T., XIAO, W.: DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutation Res., 486, 2001, 167-184.
- BROWN, L.E., SPRECHER, L., KELLER, L.R.: Introduction of exogenous DNA in *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Mol. Cell. Biol., 11, 1991, 2328-2332.
- BUDD, M.E., CAMPBELL, J.L.: The roles of the eukaryotic DNA polymerases in DNA repair synthesis. Mutation Res., 384, 1997, 157-167.
- BUCHANAN, G., SNELL, F.W.: Biochemical studies on lysin, a cell wall degrading enzyme released during fertilization in *Chlamydomonas*. Experimental Cell Research, 179, 1988, 181-193.
- BUCHELI, M., LOMMEL, L., SWEDER, K.: The defect in transcription-coupled repair displayed by a *Saccharomyces cerevisiae rad26* mutant is dependent on carbon source and is not associated with a lack of transcription. Genetics, 158, 2001, 989-997.
- BUD, M.E., CAMPBELL, J.L.: The roles of eukaryotic DNA polymerases in DNA repair synthesis. Mutation Res., 384, 1997, 157-167.
- CARRIER, W.L., SETLOW, R.B.: Endonuclease from *Micrococcus luteus* which has activity toward ultraviolet-irradiated deoxyribonucleic acid: purification and properties. Journal of Bacteriology, 102, 1970, 178-186.
- CERUTTI, H., JOHNSON, A.M., GILLHAM, N.W., BOYNTON, J.E.: A Eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*:

- integration into the nuclear genome and gene expression. *Genetics*, 145, 1997, 97 – 110.
- CHANET, R., MAGANA-SCHWENCKE, N., FABRE, F.: Potential DNA binding domains in the *RAD18* gene product of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 74, 1988, 543 - 547.
- CHANKOVA, S.G., MEHANDJIEV, A.D., BLAGOEVA, E.D., PTITSINA, S.N., SERGEEVA, S.A., SHEVCHENKO, V. A.: Plant radioresistance and DNA repair efficiency in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pisum sativum*. *Biologia Plantarum*, 36, 1994, 583 - 589.
- CHEN, J., MITCHELL, D.L., BRITT, A.B.: A light-dependent pathway for the elimination of UV-induced pyrimidine (6-4) pyrimidine photoproducts in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 6, 1994, 1311-1317.
- COX, J.L., SMALL, G.D.: Isolation of photoreactivation-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *Mutation Res.*, 149, 1985, 249-255.
- CUNNINGHAM, R.P.: DNA glycosylases. *Mutation Res.*, 383, 1997, 189-196.
- CUNNINGHAM, R.P., CHRISTENSEN, E.R., TESTER, D.J., KIM, C.Y., ROCHE, P.C., BURGART, L.J., THIBODEU, S.N.: Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Research*, 58, 1998, 3455-3460.
- DANIELS, D.S., TAINER, J.A.: Conserved structural motifs governing the stoichiometric repair of alkylated DNA by O⁶ alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Mutation Res.*, 460, 2000, 151-163.
- DAVIES, D. R.: UV-sensitive mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mutation Res.*, 4, 1967, 765-770.
- DAVIES, D. R.: Electrophoretic analysis of wall glucoproteins in normal and mutant cells. *Exp. Cell Res.*, 73, 1972, 512-516.
- DAVIES, D. R., THORBURN, M.A.: The effect of dose rate in relation to hypoxia, and the role of repair systems in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Radiation Research.*, 35, 1968, 401-409.
- DEBUCHY, R., PURTON S., ROCHAIX, J.D.: The arginosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: An important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J.*, 8, 1989, 2803 - 2809.
- DEISENHOFER, J.: DNA photolyases and cryptochromes. *Mutat. Res.*, 460, 2000, 143–149.

- DOETSCH, P.W., CUNNINGHAM, R.P.: The enzymology of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Mutation Res.*, 236, 1990, 173-201.
- DOWLING, E.L., MOLONEY, D.H., FOGEL, S.: Meiotic recombination and sporulation in repair-deficient strains of yeast. *Genetics*, 109, 1985, 283-302.
- DOLLING, J.-A., BOREHAM, D.R., BROWN, D.L., RAAPHORAT, G.P., MITCHEL, R.E.J.: Cisplatin-modification of DNA repair and ionizing radiation lethality in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.*, 433, 1999, 127-136.
- DUNAHAY, T.G.: Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *Biotechniques*, 15, 1993, 452-454.
- DUSENBERY, R.L., SMITH, D.P.: Cellular responses to DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 364, 1996, 133-145.
- ECHOLS, H., GOODMAN, M.F.: Fidelity mechanisms in DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.*, 60, 1991, 477-511.
- EISEN, J.A., HANAWALT, P.C.: A phylogenetic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutation Res.*, 435, 1999, 171-213.
- ELLEDGE, S.J.: Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science*, 274, 1996, 1664-1671
- FAJARDO-CAVAZOS, P., SALZAAR, C., NICHOLSON, W.L.B.: Molecular cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* spore photoproduct lyase (*spl*) gene, which is involved in repair of UV radiation-induced DNA damage during spore germination. *J. Bacteriol.*, 175, 1993, 1735-1744.
- FLATTERY-O'BRIEN, J.A., DAWES, I.W.: Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. *J. Biol. Chem.*, 273, 1998, 8564-8571.
- FASULLO, M.T., BENNETT, P., AHCHING, P., KOUDELIK, J.: The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9 checkpoint reduces the DNA damage-associated stimulation of directed translocations. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 1998, 1190-1200.
- FERNÁNDEZ, E., MATAGNE R.: *In vivo* complementation analysis of nitrate reductase-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.*, 10, 1986, 397-403.

- FERNANDEZ DE HENESTROZA, A.R., OGI, T., AOYAGI, S., CHAFIN, D., HAYES, J.J., OHMORI H, WOODGATE R.: Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 35, 2000, 1560-1572.
- FERRIS, P.J., WOESSNER, J.P., GOODENOUGH, U.W.: A sex recognition glycoprotein is encoded by the plus mating-type gene *fus1* of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Biol. Cell*, 7, 1996, 1235-1248.
- FRANKERBERG-SCHWAGER, M., FRANKENBERG, D., BLOCHER, D., ADAMZYCK, C.: Repair of DNA double-strand breaks in irradiated yeast cells under nongrowth conditions. *Radiat. Res.*, 82, 1980, 498-510.
- FRANKERBERG-SCHWAGER, M., FRANKENBERG, D., HARBICH, R.: Potentially lethal damage repair is due to the difference of DNA double-strand break repair under immediate and delayed plating conditions. *Radiat. Res.*, 111, 1987, 192-200.
- FRIEDBERG, E.C., WALKER, G.C., SIEDE, W.: DNA Repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, 1995.
- FRIEDBERG, E. C.: Deoxyribonucleic acid repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, 52, 1988, 70-102.
- FRIEDBERG, E. C.: Eukaryotic DNA repair: glimpses through yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BioAssays*, 13, 1991, 295-302.
- FRIEDBERG, E. C., BARDWELL, A.J., BARDWELL, L., WANG, Z., DIANOV, G.: Transcription and nucleotide excision repair - reflections, considerations and recent biochemical insights. *Mutation Res.*, 307, 1994, 5-14.
- FRIEDBERG, E. C., HANAWALT, P. C.: DNA Repair - Laboratory manual of research procedures, Vol. 1, Part B, Marcel Dekker, Inc., New York, 1981.
- FRIEDBERG, E. C., SIEDE, W., COOPER, A.J.: Cellular responses to DNA damage in Yeast. Vol. 1, The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Genome dynamics, protein synthesis and energetics, 1991, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 147-192.
- FRIEDBERG, E.C., WALKER, G.C., SIEDE, W.: DNA Repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, 1995.
- FROST, B. F., SMALL D. D.: The apparent lack of repair of O⁶ methylguanine in nuclear DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mutation Res.*, 181, 1987, 37-44.
- GAME, J.C.: The *Saccharomyces* repair genes at the end of the century. *Mutat Res.*, 451, 2000, 277-293.

- GARDNER, R., PUTMAN, C.W., WEINERT, T.: *RAD53*, *DUN1* and *PDS1* define two parallel G2/M checkpoint pathways in budding yeast. *EMBO J.*, 18, 1999, 3173-3185.
- GILHAM, N.W.: *Organelle heredity*, Raven, New York, 1978.
- GLASSNER, B.J., RASMUSSEN, L.J., NAJARIAN, M.T., POSNICK, L.M., SAMSON, L.D.: Generation of a strong mutator phenotype in yeast by imbalance base excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1998, 9997-10002.
- GOODENOUGH, U.W., HEUSER, J.E.: Substructure of inner dynein arms, radial spokes, and the central pair/projection complex of cilia and flagella. *J. Cell. Bio.*, 100, 1985, 2008-2018.
- GOODENOUGH, U.W.: Green yeast - meeting review. *Cell*, 70, 1992, 533-538.
- GOTH-GOLDSTEIN, R., JOHNSON, P. L.: Repair of alkylation damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 221, 1990 353-357.
- GUMPEL, N.J., ROCHAIX, J.D., PURTON, S.: Studies on homologous recombination in the green alga in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.*, 26, 1994, 438-442.
- HALL, L.M., TAYLOR, K.B., JONES, D.D.: Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 124, 1993, 75 – 81.
- HALLAENDER, A.: *Chemical mutagens - Principles and methods for their detection*. Vol I, Plenum Press, New York, 1971.
- HANAWALT, P. C.: Transcription - dependent and transcription coupled DNA repair responses. *DNA Repair mechanisms*, Alfred Benzon Symposium, 35, Copenhagen, 1992, 231-272.
- HANAWALT, P. C.: Controlling the efficiency of excision repair. *Mutat. Res.*, 485, 2001, 3-13.
- HANAWALT, P. C., MELLON, I.: DNA repair: Stranded in an active gene. *Current Biology*, 3, 1993, 67-69.
- HARRIS, E. H.: *The Chlamydomonas reinhardtii* sourcebook, Academic Press, San Diego, California, 1989.
- HARTWELL, L.H.: Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genetic instability of cancer cells. *Cell*, 71, 1992, 543-546.
- HARTWELL, L.H., WEINERT, T.A.: Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246, 1989, 629-634.

- HASNAIN, S.E., MANAVATHU, E.K., LEUNG, W.C.: DNA-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* cells: use of aminoglycoside 3'-phosphotransferase as a selectable marker. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 1985, 3647 – 3650.
- HAVELES, K.S., GEORGAKILAS, A.G., SIDERIS, E.G., SOPHIANOPOLOU, V.: Effect of radical scavengers on radiation-induced DNA double strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.*, 76, 2000, 51-59.
- HAYNES, R.H., KUNZ, B.A.: DNA repair and mutagenesis. in *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Life cycle and inheritance.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1981, 371-414.
- HAYS, S.L., FIRMENICH, A.A., BERG, P.: Complex formation in yeast double-strand break repair: Participation of Rad51, Rad52, Rad55 and Rad57. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92, 1995, 6925-6929.
- HIGGINS, D.R., PRAKASH, S., REYNOLDS, P., PRAKASH, L.: Molecular cloning and characterization of the RAD1 gene *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 26, 1983, 119-126.
- HOEIJMAKERS, J. H. J.: Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. *TIG*, 9, 1993, 211-217.
- HOLLIDAY, R.: A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.*, 5, 1964, 282-304.
- HOLMES, J., CLARK, S., MODRICH, P.: Strand-specific mismatch correction in nuclear extracts of human and *Drosophila melanogaster* cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, 5837-5841.
- HORST, C.J., WITMAN, G.B.: *Ptx1*, a nonphototactic mutant of *Chlamydomonas*, lacks control of flagellar dominance. *J. Cell Biol.*, 120, 1993, 733-741.
- HSIEH, P.: Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutat. Res.*, 486, 2001, 71–87.
- HUNTER, S. H., PROVASOLI, L., SCHATZ, A., HASKINS, C. P.: Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Am. Phil. Soc.*, 94, 1950, 152-170.
- INFANTE, A., SHELLY, L., HALL, J.L.: A *Chlamydomonas* genomic library in yeast artificial chromosomes. *Genetics*, 141, 1995, 87-93.
- IWANEJKO, L.A., JONES, N.J.: Recent advances in DNA repair and recombination. *Mutation Res.*, 408, 1998, 227-236.

- ITO, T., NAKAMURA, T., MAKI, H., SEKIGUCHI, M.: Roles of transcription and repair in alkylation mutagenesis. *Mutation Res., DNA Repair*, 314, 1994, 273-285.
- JEGGO, P., DEFAIS, T.M., SAMSOM, L., SCHENDEL, P.: An adaptive response of *E.coli* to low levels of alkylating agent: comparison with previously characterised DNA repair pathways. *Mol. Gen. Genet.*, 157, 1977, 1-9.
- JENTSCH, S., Mc GRATH, J.P., VARSHAVSKY, A.: The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature*, 329, 1987, 131-134.
- JIRICNY, J.: Eukaryotic mismatch repair: an update. *Mutation Res.*, 409, 1998, 107-121
- JOHNSON, R.E., PRAKASH, S., PRAKASH, L.: Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol η . *Science*, 283, 1999, 1001-1004.
- JOHNSON, R.E., WASHINGTON, M.T., PRAKASH, S., PRAKASH, L.: Fidelity of Human DNA polymerase η . *J. Biol. Chem.*, 275, 2000, 7447-7450.
- KANAAR, R., HOEIJMAKERS, J.H.J., VAN GENT, D.C.: Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends Cell. Biol.*, 8, 1998, 4834-4889.
- KARRAN, P., HJEMGREN, T., LINDAHL, T.: Induction of DNA glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptive response to alkylating agents. *Nature*, 296, 1982, 770-773.
- KASTAN, M.B., ZHAN, Q., EL-DEIRY, W.S., CARRIER, F., JACKS, T.: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing *p53* and *GADD45* is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71, 1992, 587-597.
- KATO, T. JR., TODO, T., AYAKI, H., ISHIZAKI, K., MORITA, T., MITRA, S., IKENAGA, M.: Cloning of a marsupial DNA photolyase gene and the lack of related nucleotide sequences in placental mammals. *Nucleic Acids Res.*, 22, 1994, 4119-4124.
- KHANNA, K.K., LAVIN, M.F.: Ionizing radiation and UV induction of *p53* protein by different pathways in ataxia-telangiectasia cells. *Oncogene*, 8, 1993, 3411-3416.
- KIM, S.T., SANCAR, A.: Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyases. *Photochem. Photobiol.*, 57, 1993, 895-904.
- KIM, S.T., MALHOTRA, C.A., SMITH, J.S., TAYLOR, A., SANCAR, A.: Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase. *Biol. Chem.*, 269, 1994, 8535-8540.

- KIMBALL, R. F.: The development of ideas about the effect of DNA repair in the induction of gene mutations and chromosomal aberrations by radiation and by chemicals. *Mutation Res.*, 186, 1987, 1-34.
- KINDLE, K.L., SCHNELL, R.A., FERNANDEZ, E., LEFEBVRE, P.A.: Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J. Cell. Biol.*, 109, 1989, 2589 - 2601.
- KINDLE, K.L.: High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, 1228 - 1232.
- KINDLE, K.L.: Nuclear transformation: technology and applications. In: Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S.: The molecular biology of chloroplast and mitochondria in *Chlamydomonas*. Pp. 41-61, 1998, Kluwer academic Publishers. Netherlands.
- KORNBERG, A., BAKER, T.: DNA synthesis. (ed.) W.H. Freeman & Co., New York, 1992.
- KRAXENBERGER, A., FRIEDL, A.A, KELLERER, A.M.: Computer simulation of pulsed field gel runs allows the quantitation of radiation-induced double-strand breaks in yeast. *Electrophoresis*, 15, 1994, 128-36.
- KROKAN, H.E., STANDAL, R., SLUPPHAUG, G.: DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem.J.*, 325, 1997, 1-16.
- KUIPERS, G.K., SLOTMAN, B.J, POLDERVAART, H.A., VAN VILSTEREN, I.M.J., REITSMA-WIJKER, C.A., LAFLEUR, M.V.M.: The role of nucleotide excision repair of *Escherichia coli* in repair of spontaneous and gamma-radiation-induced DNA damage in the *lacZ α* gene. *Mutation Res.*, 460, 2000, 117-125.
- LAHUE, R.S., AU, K.G., MODRICH, P.: DNA mismatch correction in a defined system. *Science*, 245, 1989, 160-164.
- LANE, D.P.: *p53*, guardian of the genome. *Nature*, 358, 1992, 15-16.
- LARIMER, F.W., PERRY, J.R., HARDIGREE, A.A.: The *REV1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: isolation, sequence, and functional analysis. *J. Bacteriol.*, 171, 1989, 230-237.
- LAWRENCE, C. W.: Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Genet.*, 21, 1982, 173-254.
- LEADON, S:A., AVRUTSKAYA, A.V.: Requirement for DNA mismatch repair proteins in the transcription-coupled repair of thymine glycosols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.*, 407, 1998, 177-187.

- LEFEBVRE, P.A., SILFLOW, C.D.: Perspectives; *Chlamydomonas*: The Cell and Its Genomes. *Genetics*, 151, 1999, p. 9
- LEHMANN, A.R., *et. al.* : Workshop on processing of DNA damage. *Mutation Res.*, 364, 1996, 245-270.
- LENKINEN, M.H., VILPO, L.M., VILPO, J.A.: UV- and γ -irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. *Mutat. Res.*, 352, 1996, 31-38.
- LEWIS, L.K., WESTMORELAND, J.W., RESNICK M.A.: Repair of endonuclease-induced double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisia*: Essential role for genes associated with nonhomologous end-joining. *Genetics*, 152, 1999, 1513-1529.
- LIEFSHITZ, B., STEINLAUF, R., FRIEDL, A., ECKARDT-SCHUPP, F., KUPIEC, M.: Genetic interactions between mutants of the „error-prone“ repair group of *Saccharomyces cerevisiae* and their effect on recombination and mutagenesis. *Mutation Res.*, 407, 1998, 135 - 145.
- LIN, W., WU, X., WANG, Z.: A full-length cDNA of hREV3 is predicted to encode DNA polymerase ζ for damage-induced mutagenesis in humans. *Mutat. Res.*, 433, 1999, 89-98.
- LINDAHL, T., SEDGWICK, B., SEKIGUCHI, M., NAKABEPPU, Y.: Regulation an expression of the adaptive responses to alkylating agents. *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 1988, 133-157.
- LINDAHL, T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709-715.
- LITTLE, J.W.: LexA cleavage and other self-processing reactions. *J. Bacteriol.*, 175, 1993, 4943-4950.
- LITTLE, J.W., MOUNT, D.W.: The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29, 1982, 11-22.
- LIU, S. K., TESSMAN, I.: Error-prone SOS repair can be error-free. *J. Mol. Biol.*, 216, 1990, 803-807.
- LLOYD, R.S.: Base excision repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutation Res.*, 408, 1998, 159-170
- LOEB, L.A., PRESTON, B.D.: Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Ann. Rev. Genet.*, 20, 1986, 201-230.

- LOWNDES, N.F., MURGUIA, J.R.: Sensing and responding to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10, 2000, 17-25.
- MATAGNE, R.F.: Fine structure of the *arg-7* cistron in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.*, 160, 1978, 95-99.
- MATSUMOTO, Y., KIM, K., BOGENHAGEN, D.F.: Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol Cell Biol*, 14, 1994, 6187-6197.
- MAYFIELD, S.P., KINDLE, K.L.: Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *Ch. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, 2087-2091.
- MELLON, I., SPIVAK, G., HANAWALT, P.C.: Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*, 51, 1987, 241-249.
- MEMISOGLU, A., SAMSON, L.: DNA repair functions in heterologous cells. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 31, 1996, 405-447.
- MENIEL, V., MAGANA-SCHWENCKE, N., AVERBECK, D., WATERS, R.: Preferential incision of interstrand crosslinks induced by 8-methoxypsoralen plus UVA in yeast during the cell cycle. *Mutation Res.*, 384, 1997, 23-32.
- MIADOKOVÁ, E., PODSTAVKOVÁ, S., VLČEK, D., ŠIMONOVÁ, M.: Characterization of photoreactivation-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Protistenkd.*, 139, 1991, 207-211.
- MIADOKOVÁ, E., PODSTAVKOVÁ, S., ČERVENÁK, Z., VLČEK, D.: Different responses of repair-deficient strains of *Chlamydomonas reinhardtii* to UV and MNG treatments. *Biologia*, 49, 1994, 633-637.
- MIADOKOVÁ, E., PODSTAVKOVÁ, S., VLČEK, D.: Caffeine effects on UV-mutability of repair-deficient strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algol. Studies*, 79, 1995, 109-117.
- MITCHEL, D.L.: The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem. Photobiol.* 48, 1988, 51-57.
- MITCHEL, R. E. J., MORRISON, D. P.: Heat-shock induction of ionizing radiation resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Transient changes in growth cycle distribution and recombinational ability. *Radiat. Res.*, 92, 1982, 182-187.
- MODRICH, P.: mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Ann. Rev. Genet.*, 25, 1991, 229-253.

- MODRICH, P., LAHUE, R.: Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Ann. Rev. Biochem.*, 65, 1996, 101-133.
- MOOLENAR, G.F., FRANKEN, K.L.M.S., van de PUTTE, P., GOOSEN, N.: Function of the homologous regions of the *Escherichia coli* DNA excision repair proteins UvrB and UvrC in stabilization of the UvrBC-DNA complex and 3' - incision. *Mutation Res.*, 385, 1997, 195-303.
- MOL, C.D., HOSFIELD, D.J., TAINER, J.A.: Abasic site recognition by two apurine/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify by means. *Mutation Res.*, 460, 2000, 211-229.
- MUNCE, D.B., COX, J.L., SMALL, G.D., VLČEK, D., PODSTAVKOVÁ, S., MIADOKOVÁ, E.: Genetic and biochemical analysis of photolyase mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Folia Microbiol.*, 38, 1993, 435-440.
- MURRAY, A.W.: Creative blocks: cell cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, 359, 1992, 599-604.
- MYLES, G.M., VAN HOUTEN, B., SANCAR, A.: Utilization of DNA photolyase, pyrimidine dimer endonucleases, and alkali hydrolysis of aberrant ABC excinuclease incisions adjacent to UV-induced DNA photoproducts. *Nucleic Acid Res.*, 15, 1987, 1227-1243.
- NELSON, J.A.E., SAVEREIDE, P.B., LEFEBRE, P.A.: The *CRY1* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation. *Mol. Cell Biol.*, 14, 1994, 4011-4019.
- NELSON, J.R., LAWRENCE, C.W., HINKLE, D.C.: Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase ζ . *Science*, 272, 1996, 1646-1649.
- NICHOLSON, A., HENDRIX, M., JINKS-ROBERTSON, S., CROUSE, G.F.: Regulation of mitotic homeologous recombination in yeast: functions of mismatch repair and nucleotide excision repair genes. *Genetics*, 154, 2000, 133-146.
- O'CONNOR, K.A., McBRIDE, M.J., WEST, M., YU, H., TRINH, L., YUAN, K., LEE, T., ZUSMAN, D.R.: Photolyase of *Myxococcus xanthus*, a gram-negative eubacterium, is more similar to photolyase found in Archae and „higher“ eukaryotes than to photolyase of other eubacteria. *J. Biol. Chem.*, 271, 1996, 6252-6259.
- OGAWA, T., WABIKO, H., TSURIMOTO, T., HORI, T., MASUKATA, H., OGAWA, H.: Characteristics of the purified *RecA* protein and the regulation of its synthesis *in vivo*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43, 1978, 909-915.

- OGAWA, T., YU, X., SHINOHARA, A., EGELMAN, E.H.: Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science*, 259, 1993, 1896-1899.
- PACIOTTI, V., LUCCHINI, G., PLEVANI, P., LONGHESE, M.P.: Mec1p is essential for phosphorylation of yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p. *EMBO J.*, 17, 1998, 4199-4209.
- PARIKH, S.S., MOL, C.D., HOSFIELD, D.J., TAINER, J.A.: Envisioning the molecular choreography of DNA base excision repair. *Curr. Opin. Strct. Biol.*, 9, 1999, 37-47.
- PARIKH, S.S., PUTNAM C.D., TAINER, J.A.: Lessons learned from structural results on uracil-DNA glycosylase. *Mutation Res.*, 460, 2000, 183-199.
- PAULOVICH, A.G., ARMOUR, C.D., HARTWELL, L.H.: The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17, RAD24 and MEC3 genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. *Genetics*, 150, 1998, 75-93.
- PAULOVICH, A.G., TOCZYSKI, D.P., HARTWELL, L.H.: When checkpoints fail. *Cell*, 88, 1997, 315-321.
- PASTINK, A., EEKEN J.C., LOHMAN, P.H.: Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutation Res.*, 480-481, 2001, 37-50.
- PEARL, L.H.: Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. *Mut. Research*, 460, 2000, 165-181.
- PEGG, A.E., DOLAN, M.E., MOSCHEL, R.C.: Structure, function, and inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Progress in Nucleic Acid Research and Mol. Biol.*, 51, 1995, 167-223.
- PETERSEN, J.L., LANG, D., SMALL, G.D.: Cloning and characterization of class 11 DNA photolyase from *Chlamydomonas*. *Plant. Mol. Biol.*, 40, 1999, 1063-1071.
- PETIT, C., SANCAR, A.: Nucleotide excision repair: From *E. coli* to man. *Biochimie* 81, 1999, 15-25.
- PELTOMÄKI, P.: DNA mismatch repair and cancer. *Mutation Res.*, 488, 2001, 77-85.
- PIERSEN, C.E., MCCULLOUGH, A.K., LLOYD, R.S.: AP lyases and dRPases commonality of mechanism. *Mutation Res.*, 459, 2000, 43-53.
- PODSTAVKOVÁ, S., MIADOKOVÁ E., VLČEK D.: Induction of new UV-sensitive mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Protistenkd.*, 139, 1991, 201-206.

- PODSTAVKOVÁ, S., VLČEK D., MIADOKOVÁ, E.: New DNA repair-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mutation Res.*, 293, 1992, 65-69.
- PODSTAVKOVÁ, S., VLČEK D., MIADOKOVÁ, E.: Repair genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biologia*, 49, 1994, 629-631.
- PORTNEY, M. D., ROSEN, H.: The effect of caffeine on repair in *Chlamydomonas reinhardtii*, II. Interaction of repair systems. *Mutat. Res.*, 70, 1980, 311-321.
- PRAKASH, S., PRAKASH, L.: Nucleotide excision repair in yeast. *Mutation Res.*, 451, 2000, 13-24.
- PURTON, S.P., ROCHAIX, J.D.: Complementation of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant using a genomic cosmid library. *Plant Mol. Biol.*, 24, 1994, 663-672.
- PURTON, S.P., ROCHAIX, J.D.: Characterization of the ARG7 gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Phycol*, 30, 1994, 141-148.
- RAJAGOPALAN, M., LU, C., WOODGATE, R., O'DONNELL, M., GOODMAN, M.F., ECHOLS, H.: Activity of the purified mutagenesis proteins *UmuC*, *UmuD'*, and *RecA* in replicative bypass of an abasic DNA lesion by DNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, 10777-10781.
- RATTRAY, A.J., SYMINGTON, L. S.: Use of a chromosomal inverted repeat to demonstrate that the RAD51 genes and RAD52 of *Saccharomyces cerevisiae* have different roles in mitotic recombination. *Genetics*, 1994, vol. 138, no. 3, pp. 587
- REBECK, G.W., COONS, S., CARROLL, P., SAMSON, L.: A second DNA methyltransferase repair enzyme in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1988, 3039-3043.
- REBECK, G.W., SAMSON, L.: Increased spontaneous mutation and alkylation sensitivity of *Escherichia coli* strains lacking the Ogt O⁶-methylguanine DNA repair methyltransferase. *J. Bacteriol.*, 173, 1991, 2068-2076.
- RHIND, N., RUSSELL, P.: Mitotic DNA damage and replication checkpoints in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10, 1998, 749-758.
- ROBERTS, K., GURNEY-SMITH, M., HILLS, G.J.: Structure, composition and morphogenesis of the cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Ultrastructure and preliminary chemical analysis. *J. Ultrastruct. res.*, 40, 1972, 599-613.
- ROCHAIX, J.-D.: Restriction endonuclease map of the chloroplast DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Mol. Biol.*, 126, 1978, 597-617.

- ROCHAIX, J.-D.: *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Ann. Rev. Genet.*, 29, 1995, 209-230.
- ROCHAIX, J.-D., van DILLEWIJN, J.: Transformation of green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with yeast DNA. *Nature*, 296, 1982, 70 - 73.
- ROCHAIX, J.-D., van DILLEWIJN, J., RAHIRE, M.: Construction and characterization of autonomously replicating plasmids in the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell*, 36, 1984, 925 - 931.
- ROSSELLI, W., STASIAK, A.: The ATPase activity of *RecA* is needed to push the DNA strand exchange through heterologous regions. *EMBO J.*, 10, 1991, 4391-4396.
- ROSEN, H., EBERSOLD, W. T.: Recombination in relation to ultraviolet sensitivity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 71, 1972, 247-253.
- ROSEN, H., REHN, M.M., JOHNSON, B.A.: The effect of caffeine on repair in *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Enhancement of recombination repair. *Mutation Res.*, 70, 1980, 301-309.
- RYAN, R., GRANT, D., CHIANG, K.-S., SWIFT, H.: Isolation and characterization of mitochondrial DNA from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1978, 3268-3272.
- SAGER, R.: Mendelian and non-Mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 40, 1954, 356-363.
- SAKUMI, K., SEKIGUCHI, M.: Structures and functions of DNA glycosylases. *Mutation Res.*, 236, 1990, 161-162.
- SAMBROOK, J.E., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T.: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- SAMSON, L., CAIRNS, J.: A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature*, 267, 1977, 281-283.
- SANCAR, A.: Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry*, 33, 1994, 2-9.
- SANCAR, G.B.: DNA photolyases: physical properties, action mechanism, and roles in dark repair. *Mutation Res.*, 236, 1992, 147-160.
- SANCAR, G. B., SMITH, F. W.: Interactions between yeast photolyase and nucleotide excision repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Biol.*, 9, 1989, 4767.

- SANCAR, A., FRANKLIN, K.A., SANCAR, G.B.: *Escherichia coli* DNA photolyase stimulates *uvrABC* excision nuclease *in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci., 81, 1984, p. 7397.
- SANCAR, G. B., SMITH, F. W., LORENCE, M. C., RUPPERT, C. S., SANCAR, A.: Sequences of the *Escherichia coli* photolyase gene and protein. J. Biol. Chem., 259, 1984, 6033-6038.
- SASSANFAR, M., SAMSON, L.: Identification and preliminary characterization of O⁶-methylguanine DNA repair methyltransferase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 263, 1990, 20-25.
- SCHENDEL, P. F., MICHAELI, L.: A model for mechanism of alkylation mutagenesis. Mutation Res., 125, 1984, 1-14.
- SCHNELL, R.A., LEFEBVRE, P.A.: Isolation of the *Chlamydomonas* regulatory gene NIT2 by transposon tagging. Genetics, 134, 1993, 737 – 747.
- SCHIESTL, R.H., REYNOLDS, P., PRAKASH, L., PRAKASH, L.: Cloning and sequence analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD9 gene and further evidence that its product is required for cell cycle arrest induced by DNA damage. Mol. Cell. Biol., 9, 1989, 1882-1896.
- SEEBERG, E., EIDE, L., BJØRÅS, M.: The base excision repair pathway. TIBS, 20, 1995, 391-396.
- SELBY, C.P., SANCAR, A.: Gene- and strand-specific repair *in vitro*: partial purification of a transcription-repair coupling factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1991, 8232-8236.
- SELBY, C.P., SANCAR, A.: Molecular mechanism of transcription-repair coupling. Science, 260, 1993, 53-58.
- SETLOW, P.B.: I will survive: protecting and repairing spore DNA. J. Bacteriol., 174, 1992, 2737-2741.
- SHIMOGAWARA, K., FUJIWARA, S., GROSSMAN, A.R., USUDA, H.: High efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Genetics, 148, 1998, 1821-1828.
- SHINOHARA, A., OGAWA, T.: Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. TIBS, 20, 1995, 387 – 391.

- SHINOHARA, A., SHINOHARA, M., OHTA, T., MATSUDA, S. OGAWA, T.: Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes Cells*, 3, 1998, 91-94.
- SHEVELL, D.E., FRIEDMAN, B.M., WALKER, G.C.: Resistance to alkylation damage in *Escherichia coli*: role of Ada protein in induction of the adaptive response. *Mutat. Res.*, 233, 1990, 53-72.
- SIEDE, W., FRIEDBERG, A.S., DIANOVA, I., FRIEDBERG, E.C.: Characterization of G₁ checkpoint control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* following exposure to DNA-damaging agents. *Genetics*, 138, 1994, 271-281.
- SINGER, B., KUŚMIEREK, J.T.: Chemical mutagenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 51, 1982, 655-693.
- SINGER, B.: O⁶-alkyl pyrimidines in mutagenesis and carcinogenesis: occurrence and significance. *Cancer. Res.*, 46, 1986, 4879-4885.
- SINGHAL, R.K., HINKLE, D.C., LAWRENCE, C.W.: The *REV3* gene of *S. cerevisiae* is transcriptionally regulated more like a repair gene than one encoding a DNA polymerase. *Mol. Gen. Genet.*, 236, 1992, 17-24.
- SLIVKOVÁ, A., MIADOKOVÁ, V., PODSTAVKOVÁ, S., VLČEK, D.: Responses of *Chlamydomonas reinhardtii* repair-deficient strains to X-ray irradiation. *Biologia*, 53, 1998, 587-589.
- SLOUN VAN, P.P.H., ROMEIJN, R.J., EEKEN, J.C.J.: Molecular cloning, expression and chromosomal localisation of the mouse *Rev3l* gene, encoding the catalytic subunit of polymerase ζ. *Mutation Res.*, 433, 1999, 109-116.
- SMALL, G. D.: Loss of nuclear photoreactivating enzyme following ultraviolet irradiation of *Chlamydomonas*. *Biochim. Biophys. Acta*, 606, 1980, 105-112.
- SMALL, G. D.: Repair for nuclear and chloroplast DNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mutation Res.*, 181, 1987, 31-35.
- SMALL, G.D.: Characterization of DNA photolyase gene from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings: Biology and Taxonomy of Green Algae II*, 1993, p. 70.
- SMALL, G. D., GREIMANN, C. S.: Repair of pyrimidine dimers in ultraviolet irradiated *Chlamydomonas*. *Photochem. Photobiol.*, 25, 1977, 183-187.
- SMALL, G. D., GREIMANN, C. S.: Photoreactivation and dark repair of ultraviolet light -induced pyrimidine dimers in chloroplast DNA. *Nucleic Acid Research*, 4, 1977, 1893-2902.
- SMITH, K. C., HANAWALT, P. C.: *Molekularnaja fotobiologia*. Mir, Moskva, 1972.

- SOJFER, V. N.: Molekularnyje mechanizmy mutageneza. Nauka, Moskva, 1969.
- STAPLETON, A. E.: Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *The Plant Cell*, 4, 1992, 1353-1358.
- STUCKI, M., PASCUCCI, B., PARLANTI, E., FORTINI, P., WILSON, S.H., HUBSCHER, U., DOGLIOTTI, E.: Mammalian base excision repair by DNA polymerase δ and ϵ . *Oncogene*, 17, 1998, 835-843.
- SUGASAWA, K., NG, J.M.Y., MASUTANI, C., IWAI, S., VAN DER SPEK, P., EKER, A.P.M., HANAOKA, F., BOOTSMA, D., HOEIJMAKERS, J.H.J.: *Xeroderma pigmentosum* group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Molecular Cell* 2, 1998, 223-232.
- SUTER, B., LIVINGSTONE-ZATCHEJ, M., THOMA, F.: Chromatin structure modulates DNA-repair by photolyase in vivo. *EMBO J.*, 16, 1997, 2150-2160.
- SUTTON, M.D., SMITH, B.T., GODOY, V.G., WALKER, G.C.: The SOS response: recent insights into *umuDC*-dependent mutagenesis and DNA Damage tolerance. *Ann. Rev. Genet.*, 34, 2000, 479-497.
- SWANSON, R.L., MOREY, N.J., DOETCH, P.W., JINKS-ROBERTSON, S.: Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 19 1999, 2929-2935.
- SWEDER, K.S.: Nucleotide excision repair in yeast. *Curr. Genet.*, 27, 1994, 1-16.
- SWEDER, K.S., VERHAGE, R.A., CROWLEY, D.J., CROUSE, G.F., BROUWER, J., HANAWALT, P.C.: Mismatch repair mutants in yeast are not defective in transcription-coupled DNA repair of UV-induced DNA damage. *Genetics*, 143, 1996, 1127-1135.
- SWINTON, D. C., HANAWALT, P. C.: The fate of pyrimidine dimers in ultraviolet irradiated *Chlamydomonas*. *Photochem. Photobiol.*, 17, 1973, 361-375.
- ŠETLÍK, I., ZACHLEDER, V.: Buněčný cyklus u řas. In: Nečas, O., Streiblová, E., Vondrejs, V.: Buněčný cyklus mikroorganismů. ACADEMIA, Praha, 1981, 152-163.
- TAKAHASHI, M., SCHNARR, M.: Investigation of *RecA* polynucleotide interactions from measurement of *LexA* repressor cleavage kinetics. *Europ. J. Biochem.*, 183, 1989, 617-622.

- TAKATA, M., SASAKI, M.S., SONODA, E., MORRISON, C., HASHIMOTO, M., UTSUMI, H., YAMAGUCHI-IWAI, Y., SHINOHARA, A., TAKEDA, S.: 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. *EMBO J.*, 17, 1998, 5497-5508.
- TANG, M.S., SMITH, K.C.: The effects of *laxA*, *recB21*, *recF143*, and *uvrD3* mutations on liquid-holding recovery in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli* K12 *recA56*. *Mutat. Res.*, 80, 1981, 15-25.
- TANG, D.K.H., QIAO, S.-Y., WU, M.: Insertion mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation and heterologous DNA. *Biochem. Molec. Biol. Int.*, 36, 1995, 1025-1035.
- THACKER, J.: The role of homologous recombination process in the repair of severe forms of DNA damage in mammalian cells. *Biochimie*, 81, 1999, 77-85.
- THEIS K, SKORVAGA M, MACHIUS M, NAKAGAWA N, VAN HOUTEN B, KISKER C. :The nucleotide excision repair protein UvrB, a helicase-like enzyme with a catch. *Mutation Res.*, 460, 2000, 277-300.
- TIMSON, D.J., SINGLETON, M.R., WIGLEY, D.B.:DNA ligases in the repair and replication of DNA. *Mutation Res.*, 460, 2000, 301-318.
- TODO, T., TAKEMORI, H., RYO H., IHARA M., MATSUNAGA T., NIKAIDO O., SARO., K., NOMURA, T.: A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Nature*, 361, 1993, 371-374.
- TODO, T., RYO, H., YAMAMOTO, K., TOH, H., INUI, T., AYAKI H., NOMURA, T., IKENAGA, M.: Similarity among the *Drosophila* (6-4) photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science*, 272, 1996, 109-112.
- TODO, T., TSUJI, H., OTOSHI, E., HITOMI, K., KIM, S.T., IKENAGA, M.: Characterization of a human homolog of (6-4) photolyase. *Mutation Res.*, 384, 1997, 195-204.
- TODO, T.: Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutation Res.*, 434, 1999, 89-97.
- TOMKINSON, A.E., BARDWELL, A.J., TAPPE, N., RAMOS, W., FRIEDBERG, E.C.: Purification of *Rad1* protein from *Saccharomyces cerevisiae* and further characterization of the *Rad1/Rad10* endonuclease complex. *Biochemistry*, 33, 1994, 305-311.

- VELEMÍNSKÝ, J., GICHNER, T.: Interakce alkylačných látek s DNA a jejich význam pro vznik genových mutací. *Biologické listy*, 47, 1982, 33-58.
- VLČEK, D., PODSTAVKOVÁ, S., MIADOKOVÁ, E.: Study of selected characteristics of the *Chlamydomonas reinhardtii* strains with altered sensitivity to UV radiation. *Biologia plantarum*, 23, 1981, 427-433.
- VLČEK, D., MIADOKOVÁ, E., PODSTAVKOVÁ, S., ADAMS, G. M. W., SMALL, G. D.: General characteristics, molecular and genetic analysis of two new UV-sensitive mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mutation Res.*, 183, 1987, 169-175.
- VLČEK, D., PODSTAVKOVÁ, S., MIADOKOVÁ, E., VLČKOVÁ, V.: The repair systems in green algae as compared with present knowledge in heterotrophic microorganisms. *Arch. Protistenkd.* 139, 1991, 193-199.
- VLČEK, D., PODSTAVKOVÁ, S., MIADOKOVÁ, E.: Interactions between photolyase and dark repair processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mutation Res.*, 336, 1995, 251-256.
- VLČEK, D., SLIVKOVÁ, A., PODSTAVKOVÁ, S., MIADOKOVÁ: A *Chlamydomonas reinhardtii* UV-sensitive mutant *uvs15* is impaired in a gene involved in several repair pathways. *Mutation Res.*, 285, 1997, 243-249.
- VLČKOVÁ, V., VLČEK, D.: Reparačné systémy a ich vzťah k mutagenéze pri heterotrofných a autotrofných eukaryotických mikroorganizmoch. *Biologické listy*, 49, 1984, 241-256.
- WAGNER, J., GRUZ, P., KIM, S.R., YAMADA, M., MATSUI, K., FUCHS, R.P., NOHMI, T.: The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA PolIV, involved in mutagenesis. *Mol. Cell.*, 4, 1999, 281-286.
- WALKER, G. C.: Inducible DNA repair system. *Ann. Rev. Biochem.*, 54, 1983, 425-437.
- WALKER, G. C.: SOS-regulated proteins translesion DNA synthesis and mutagenesis. *TIBS*, 20, 1995, 416-421.
- WANG, Z.: Translesion synthesis by the UmuC family of DNA polymerases. *Mutation Res.*, 486, 2001, 59-70.
- WARD, J.F.: DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 35, 1988, 95-125.
- WARD, J.F.: The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int. J. Radiat. Biol.*, 57, 1990, 1141-1150.

- WARD, J.F.: DNA damage as the cause of ionizing radiation-induced gene activation. *Radiat. Res.*, 138, 1994, 85-88.
- WEBER, L., BYERS, B.: A *RAD9*-dependent checkpoints blocks meiosis of *cdc13* yeast cells. *Genetics*, 131, 1992, 55-63.
- WEEKS, D.P.: *Chlamydomonas*: an increasingly powerful model plant cell system - meeting report, 1992.
- WEINERT, T.A.: DNA damage checkpoints update: getting molecular. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8, 1998, 185-193.
- WEINERT, T.A., HARTWELL, L.H.: The *RAD9* gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 241, 1988, 317-322.
- WEINERT, T.A., HARTWELL, L.H.: Characterization of *RAD9* of *Saccharomyces cerevisiae* and evidence that its function acts posttranslationally in cell cycle arrest after DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 10, 1990, 6554-6564.
- WEINERT, T.A., HARTWELL, L.H.: Cell cycle arrest of *cdc* mutants and specificity of the *RAD9* checkpoint. *Genetics*, 134, 1993, 63-80.
- WEINERT, T., LYDALL, D.: Cell cycle checkpoints, genetic instability and cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 4, 1993, 129-140.
- WITMAN, G.B.: *Chlamydomonas* phototaxis. *Trends Cell. Biol.*, 3, 1993, 403-408.
- WOLFF, S., CLEAVER, J.E.: Absence of DNA repair replication after chemical mutagen damage in *Vicia faba*. *Mutation Res.*, 20, 1973, 71-76.
- WOOD, R.D.: DNA repair in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 1996, 135-167.
- WEI XIAO, CHOW, B.L., FONTANIE, T. , LIBIN MA , BACCHETTI, S., HRYCIW, T. , BROOMFIELD, S.: Genetic interactions between error-prone and error-free postreplication repair pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.*, 435, 1999, 1-11.
- XIAO, W., CHOW, B.L., FONTANIE, T., MA, L., BACCHETTI, S., HRYCIW, T., BROOMFIELD, S.: Genetics interactions between error-prone and error-free postreplication repair pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.*, 435, 1999, 1-11.
- YAMAMOTO, K., SATAKE, M., SHIGAWA, H., FUJIWARA, Y.: Amelioration of the ultraviolet sensitivity of *Escherichia coli recA* mutant in the dark by photoreactivating enzyme. *Mol. Gen. Genet.*, 190, 1983, 511-515.

- YANG, W.: Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutation Res.*, 460, 2000, 245–256.
- YANG, S.S., YEH, E., SALMON., E.D., BLOOM, K.: Identification of mid-anaphase checkpoint in budding yeast. *J. Cell Biol.*, 136, 1997, 345-354.
- YAROSH, D. B.: The role of O⁶ - methylguanine - DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.*, 145, 1985, 1-16.
- YASUI, A., EKER, A.P.M., YASUHIRA, S., YAJIMA, H., KOBAYASHI, T., TAKAO, M., OIKAWA, A.: A new class of DNA photolyase present in various organisms including aplacental mammals. *EMBO J.*, 13, 1994, 6143-6151.
- YU, S., TENG, Y., LOWNDES, N.F., WATERS, R.: *RAD9*, *RAD24*, *RAD16* and *RAD26* are required for the inducible nucleotide excision repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers from the transcribed and non-transcribed regions of the *Saccharomyces cerevisiae MFA2* gene. *Mutation Res.*, 485, 2001, 229–236.
- ZHANG, Z., YUAN, F., WU, X., RECHKOBLIT, O., TAYLOR, J.-S., GEACINTOV, N.E., WANG, Z.: Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase η . *Nuc. Acid Res.*, 28, 2000, 4717-4724.
- ZHANG, H., HERMAN, P.L., WEEKS, D.P.: Gene isolation through genomic complementation using an indexed library of *Chlamydomonas reinhardtii* DNA. *Plant Mol. Biol.*, 24, 1994, 663-672.