

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽA PODERGAJS

**VPLIV PROTEINOV APOBEC3 NA RETROTRANSPOZICIJO LINE-2
RETROTRANSPOZONOV**

**INFLUENCE OF APOBEC3 PROTEINS ON RETROTRANSPOSITION OF
LINE-2 RETROTRANSPOSONS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Institutu Jožef Štefan (IJS) v Ljubljani na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti B2 pod mentorstvom izr. prof. dr. Metke Renko in somentorstvom asist. dr. Nike Lovšin.

Analizo nukleotidnega zaporedja DNA je opravilo podjetje MWG Biotech AG-Sequencing Service, Ebersberg, Nemčija.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Metki Renko za pregled diplomskega dela.

Še posebej se zahvaljujem somentorici asist. dr. Niki Lovšin za sodelovanje, podporo, in svetovanje pri samem delu.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim zaposlenim na IJS za pomoč pri praktičnem delu.

Nazadnje se zahvaljujem tudi staršem, ki so me podpirali in mi stali ob strani ter sestri za pomoč pri obdelavi slik.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Metke Renko, univ. dipl. kem. in somentorstvom asist. dr. Nike Lovšin, univ. dipl. kem.

KAZALO

KAZALO	III
POVZETEK.....	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VIII
1 UVOD	- 1 -
1.1 TRANSPOZICIJSKI ELEMENTI	- 1 -
1.1.1 <i>Retrotranspozoni</i>	- 1 -
1.1.2 <i>LINE retrotranspozoni</i>	- 3 -
1.1.2.1 LINE-2 RETROTRANSPOZONI	- 3 -
1.1.3 <i>Mehanizem retrotranspozicije</i>	- 4 -
1.1.4 <i>Vpliv retrotranspozonov na genomsko stabilnost</i>	- 5 -
1.1.5 <i>Uporaba retrotranspozonov</i>	- 5 -
1.1.6 <i>Obračni mehanizmi organizmov na retrotranspozicijo</i>	- 6 -
1.2 PROTEINI APOBEC3	- 7 -
1.2.1 <i>Mesta izražanja proteinov APOBEC3 pri sesalcih</i>	- 7 -
1.2.2 <i>Struktura proteinov APOBEC3</i>	- 8 -
1.2.3 <i>Delovanje proteinov APOBEC3 na retrovirusne učinkovine</i>	- 9 -
1.2.4 <i>Proteini APOBEC3 kot protivirusne učinkovine</i>	- 12 -
1.2.5 <i>Mehanizem delovanja na retrotranspozone</i>	- 14 -
2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	- 17 -
3 MATERIALI IN METODE	- 18 -
3.1 MATERIALI	- 18 -
3.1.1 <i>Kemikalije</i>	- 18 -
3.1.2 <i>Topila</i>	- 19 -
3.1.3 <i>Reagenti</i>	- 19 -
3.1.4 <i>Raztopine in geli</i>	- 20 -
3.1.5 <i>Encimi</i>	- 22 -
3.1.6 <i>Protitelesa</i>	- 22 -

3.1.7 <i>Oligonukleotidi</i>	- 22 -
3.1.8 <i>Plazmidi in celice</i>	23
3.1.9 <i>Kompleti</i>	- 24 -
3.1.10 <i>Laboratorijska oprema</i>	- 24 -
3.2 METODE	- 25 -
3.2.1 <i>Subkloniranje</i>	- 25 -
3.2.1.1 RESTRIKCIJA	- 25 -
3.2.1.2 AGAROZNA ELEKTROFOREZA	- 25 -
3.2.1.3 IZOLACIJA IZ GELA	- 26 -
3.2.1.4 LIGACIJA	- 26 -
3.2.1.5 TRANSFORMACIJA	- 26 -
3.2.1.6 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA IZ BAKTERIJSKIH CELIC (MINIPREPARACIJA)	- 27 -
3.2.2 <i>Delo s celičnimi kulturami</i>	- 29 -
3.2.2.1 293T CELICE	- 29 -
3.2.2.2 GOJENJE SESALSKIH CELIC	- 29 -
3.2.2.3 PRECEPLJANJE CELIC	- 29 -
3.2.3 <i>Preverjanje ekspresije proteinov APOBEC3 v sesalskih celicah</i>	- 30 -
3.2.3.1 TRANSFEKCIJA	- 30 -
3.2.3.2 PRIPRAVA LIZATA CELIC	- 30 -
3.2.3.3 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA Z DODATKOM NATRIJEVEGA DODECILSULFATA (NADS-PAGE)	- 31 -
3.2.3.4 PRENOS WESTERN (WB)	- 31 -
3.2.4 <i>Določanje hitrosti retrotranspozicije</i>	- 32 -
3.2.4.1 SELEKCIJA CELIC HELA Z GENETICINOM	- 34 -
3.2.5 <i>Določanje mutacij G v A v kopijah retrotranspozona</i>	- 35 -
3.2.5.1 DOLOČANJE NA NOVO INTEGRIRANIH KOPIJ RETROTRANSPOZONA V GENOMU	- 36 -
3.2.5.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	- 36 -
3.2.5.3 KLONIRANJE GENA NEO	- 38 -
3.2.5.4 DOLOČANJE MUTACIJ IZ GVANINA V ADENIN S PRIMERJAVO NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ DVEH GENOV	- 39 -
4 REZULTATI	- 40 -
4.1 SUBKLONIRANJE	- 40 -

4.2	POTRDITEV EKSPRESIJE PROTEINOV	- 43 -
4.2.1	<i>Določanje učinkovitosti transfekcije</i>	- 43 -
4.2.2	<i>Prikaz ekspresije proteinov</i>	- 44 -
4.3	DOLOČANJE HITROSTI RETROTRANSPOZICIJE.....	- 45 -
4.4	DOLOČANJE MUTACIJ V KOPIJAH ZFL2 RETROTRANSPOZONA	- 47 -
4.4.1	<i>PCR reakcija</i>	- 47 -
4.4.2	<i>Določanje mutacij G v A v kopijah retrotranspozona</i>	- 48 -
5	RAZPRAVA	- 50 -
5.1	POTRDITEV EKSPRESIJE PROTEINOV S PRENOSOM WESTERN	- 50 -
5.2	DOLOČANJE HITROSTI RETROTRANSPOZICIJE V PRISOTNOSTI PROTEINOV APOBEC3	- 51 -
5.3	DOLOČANJE MUTACIJ IZ GVANINA V ADENIN V KOPIJAH RETROTRANSPOZONA.....	- 52 -
6	SKLEPI	- 54 -
7	LITERATURA	- 55 -

POVZETEK

Retrotranspozoni so odseki molekule DNA, ki se premikajo iz enega mesta v genomu na drugo. Ta proces se imenuje retrotranspozicija. Retrotranspozoni predstavljajo pri človeku skoraj polovico genoma in so pogosto krivci za različne genetske bolezni. Najbolj številna skupina retrotranspozonov so dolga razpršena ponavljača se zaporedja oziroma LINE retrotranspozoni. Organizem je v obrambo proti nestabilnosti genoma razvil tudi proteine APOBEC3, ki preprečujejo razmnoževanje retrotranspozonov in tudi številnih retrovirusov. Proteini APOBEC3 so po delovanju encimi, in sicer citidinske deaminaze. Retrovirusom onemogočijo razmnoževanje tako, da v molekuli RNA virusa pretvarjajo citozin v uracil, kar vodi v nastanek mutacij iz gvanina v adenin (G v A) v nastajajoči molekuli DNA virusa. Predvidevajo, da po enakem mehanizmu inhibirajo tudi retrotranspozicijo.

V okviru diplomskega dela smo preverili vpliv proteinov APOBEC3 na retrotranspozicijo LINE-2 retrotranspozona. Primerjali smo hitrost retrotranspozicije označenega retrotranspozona v prisotnosti šestih različnih proteinov APOBEC3. Preverili smo tudi ali ti proteini delujejo po predpostavljenem mehanizmu pretvorbe (deaminacije) citozina v uracil, tako, da smo v kopijah retrotranspozona iskali značilne mutacije G v A.

Najprej smo zapis za posamezen protein APOBEC3 vnesli v ekspresijske vektorje in s prenosom western preverili izražanje v sesalskih celicah. Nato smo v celice vnesli zapis za posamezen protein APOBEC3 skupaj z zapisom za označen retrotranspozon in spremljali inhibitorne učinke posameznega proteina APOBEC3 na retrotranspozicijo. Največji vpliv na retrotranspozicijo LINE-2 retrotranspozona imajo proteini A3F, A3G in A1, najmanjši pa A3A, A3C in mA3. Prisotnost mutacij iz gvanina v adenin smo preverili z določanjem nukleotidnega zaporedja kopije označenega retrotranspozona, vključenega v genom, nato pa to zaporedje primerjali s tistim pred retrotranspozicijo. V nobeni kopiji retrotranspozona ni bilo prisotnih mutacij, kar pomeni, da proteini APOBEC3 ne inhibirajo retrotranspozicije LINE-2 retrotranspozonov po predpostavljenem mehanizmu deaminacije.

ABSTRACT

Mobile parts of DNA are called retrotransposons and are able to move in the genome from one part to another in the process called retrotransposition. In humans, retrotransposons cover almost half of the genome. Mobility of these elements can cause different genetic disorders. Long interspersed nuclear elements or LINE elements are the largest group of retrotransposons. In order to limit these negative effects of retrotransposition genome developed APOBEC3 proteins. These proteins inhibit the mobility of retrotransposons and retroviruses. APOBEC3 proteins belong to the group of enzymes, called cytidine deaminases. Replication of retroviruses is prevented by APOBEC3 protein's ability to convert (deaminate) cytosine to uracil in the virus's RNA molecule, which results in guanine to adenine (G to A) mutations in developing virus's DNA. It is possible that APOBEC3 can inhibit retrotransposition by the same mechanism.

We have studied the inhibitory effect of APOBEC3 proteins on LINE-2 retrotransposition by rating decrease of retrotransposition in the presence of six APOBEC3 family members. To examine whether cytidine deamination would explain the mechanism by which the retrotransposition is inhibited, we have searched for specific G to A mutations in retrotransposon's copies.

First we inserted informations, that code for different APOBEC3 proteins, in expression plasmids. The following protein expressions in mammalian cells were confirmed by western blot. Next we inserted information for marked retrotransposon and six APOBEC3 expression plasmids into mammalian cells respectively, so we were able to observe protein's inhibitory effects on retrotransposition. APOBEC3 proteins differentially reduce LINE-2 retrotransposition. The most significant effect have A3F, A3G and A1, and the least significant one have A3A, A3C and mA3. Examination of G to A mutations was made by comparing nucleotide sequence from retrotransposon's copy, integrated in the genome and retrotransposon before retrotransposition. No mutations were found, which means that inhibitory effect of APOBEC3 proteins is not result of cytidine deamination, but some other mechanism.

SEZNAM OKRAJŠAV

293T	embrionalne človeške ledvične celice 293, opremljene z velikim T-antigenom virusa SV40
A	adenin
APS	amonijev persulfat
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin
C	citozin
CD	katalitična domena
cDNA	komplementarna DNA
Cys	cistein
dH₂O	deionizirana voda
DMEM	Eaglovo gojišče, modificirano po Dulbeccu
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPBS	fosfatni pufer s solmi, modificiran po Dulbeccu
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
FBS	fetusni serum goveda
G	gvanin
Glu	glutamin
HeLa	rakave celice ustja materničnega vratu
His	histidin
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertanijev medij
LBA	LB medij z dodanim ampicilinom
LINE	dolga razpršena ponavlajoča se zaporedja
LTR	dolge končne ponovitve
mRNA	informacijska RNA
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna elektroforeza ob prisotnosti natrijevega dodecilsulfata

ORF	odprt bralni okvir
PBS	fosfatni pufer z NaCl in KCl
PCR	verižna reakcija s polimerazo
Pro	prolin
RNA	ribonukleinska kislina
TAE	Tris-acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometan
Tween	polioksietilensorbitan; anionski detergent
U	uracil
UTR	neprevajana regija
Vif	pomožni protein virusa HIV
WB	prenos western
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid

1 UVOD

1.1 TRANSPORIZIJSKI ELEMENTI

Transpozicijski elementi so mobilna zaporedja DNA, ki se prenašajo po in med genomi. S svojo aktivnostjo lahko spreminjači genome (rekombinacija, insercija delecija, povečanje velikosti geoma) in imajo pomembno vlogo pri evoluciji genomov. Razširjeni so pri vseh do sedaj raziskovanih organizmih, prokariontih in evkariontih in lahko predstavljajo velik delež genoma. Transpozicijske elemente delimo glede na mehanizem transpozicije v dva razreda:

- I razred: retrotranspozoni, ki se prenašajo preko RNA intermediata po principu »kopiraj in prilepi«
- II razred: DNA transpozoni, ki se prenašajo preko DNA intermediata po principu »izreži in prilepi« (1, 2).

Druga delitev transpozicijskih elementov je na avtonomne in neavtonomne elemente. Avtonomni elementi nosijo zapis za encime, ki so potrebni za transpozicijo. Neavtonomni elementi pa sami niso sposobni transpozicije, saj nimajo funkcionalnih proteinov, potrebnih za transpozicijo, zato za svoj prenos uporabljajo encime aktivnih celih elementov (običajno avtonomnih elementov). (3, 4).

1.1.1 Retrotranspozoni

Retrotranspozoni so transpozicijski elementi, ki se prenašajo po in med genomi preko RNA intermediata (1, 2). Za avtonomne retrotranspozone je značilno, da kodirajo reverzno transkriptazo, encim, ki omogoča prepis vmesnega RNA intermediata v ekstrakromosomalno DNA, ta pa se nato vključi v kromosomalno DNA. Retrotranspozonom se z retrotranspozicijo število kopij povečuje. Retrotranspozone glede na njihovo strukturo delimo na:

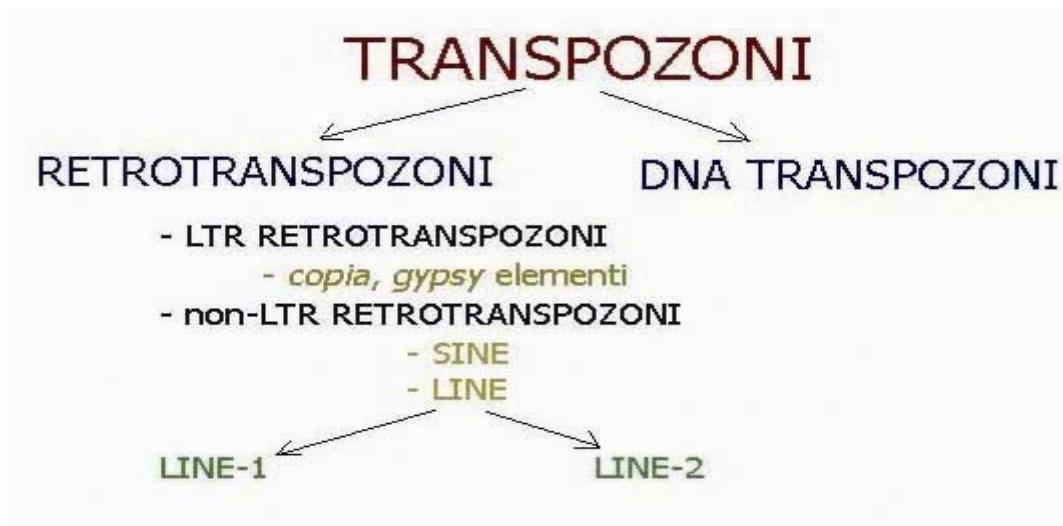
- retrotranspozone z dolgimi končnimi ponovitvami (long terminal repeat retrotransposons, LTR retrotranspozoni)
- retrotranspozone brez dolgih končnih ponovitev (non-LTR retrotranspozoni)

LTR-retrotranspozoni so razširjeni pri vseh evkarijontih (5). Najbolj raziskana LTR-retrotranspozona sta elementa *copia* in *gypsy*. Iz Ty3-*gypsy* elementov naj bi se s pridobitvijo gena *env* razvili retrovirusi.

Non-LTR retrotranspozoni so ena izmed najbolj razširjenih in najstarejših skupin transpozicijskih elementov. Prisotni so tako v najpreprostejših evkarijontih kot tudi pri človeku. Razdelimo jih v dve skupini:

- dolga razpršena ponavljača se zaporedja (long interspersed nuclear elements, LINE)
- kratka razpršena ponavljača se zaporedja (short interspersed nuclear elements, SINE) (6) (*Slika 1*).

Vsem predstavnikom retrotranspozonov so skupni geni *gag* in *pol*. Poimenovanje *gag* in *pol* izvira iz analogije z retrovirusi. Gen *gag* nosi zapis za protein, ki se veže na nukleinske kisline, gen *pol* pa nosi zapis za reverzno transkriptazo (RT) in endonukleazo (EN) (7).



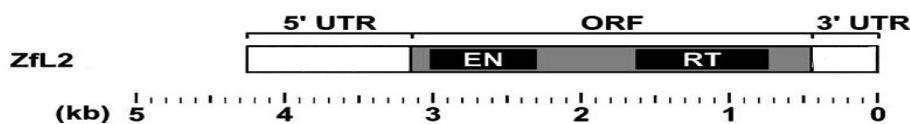
Slika 1: Delitev transpozonov. Transpozoni se glede na mehanizem transpozicije delijo v 2 razreda: DNA transpozone in retrotranspozone. Retrotranspozoni se delijo naprej glede na njihovo strukturo, in sicer na retrotranspozone z dolgimi končnimi ponovitvami (LTR retrotranspozoni) ter tiste brez dolgih končnih ponovitev (non-LTR retrotranspozoni). Non-LTR retrotranspozoni vključujejo dve skupini predstavnikov: kratka razpršena ponavljača se zaporedja (SINE) in dolga razpršena ponavljača se zaporedja (LINE). Skupina LINE obsega 2 podskupini retrotranspozonov: LINE-1, ki je najbolj preučevan LINE element ter LINE-2 (6).

1.1.2 LINE retrotranspozoni

LINE elementi so dolga razpršena ponavljaljajoča se zaporedja. Zanje je značilno, da imajo en ali dva odprta bralna okvira (open reading frame, ORF). Odprta bralna okvira nosita zapis za reverzno transkriptazo in endonukleazo. 5' neprevedljiva regija (untranslated region, UTR) vsebuje skrajšano promotorsko zaporedje, na 3' koncu neprevedljive regije pa je poli-A-rep. Najbolj preučevan LINE element je LINE-1, saj pri človeku tvori kar 17% genoma (6). V človeškem genomu je prisotnih 500 000 kopij, od tega 3000 do 5000 celih elementov, aktivnih pa je le 40 do 80 elementov (8, 9). V zadnjih 100 milijonih letih so LINE-1 pri sesalcih bistveno vplivali na evolucijo genomov (10).

1.1.2.1 LINE-2 RETROTRANSPOZONI

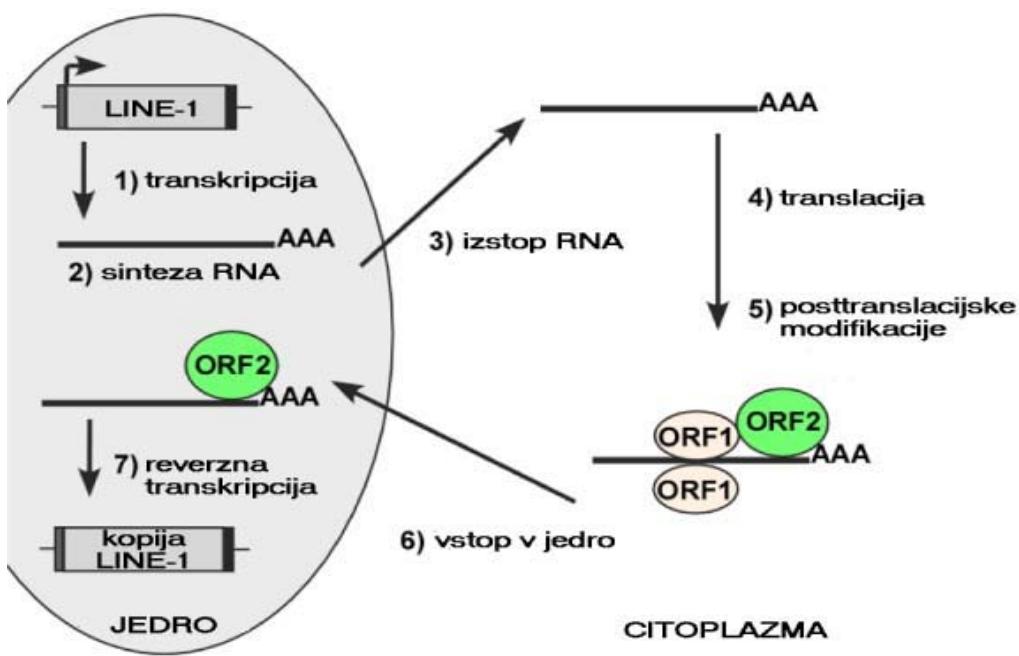
LINE-2 elementi so non-LTR retrotranspozoni, ki so jih doslej našli pri različnih vretenčarjih, prisotni pa so tudi pri nekaterih nevretenčarjih (11). Pri človeku tvorijo približno 3% genoma. V nasprotju z aktivnimi LINE-1 retrotranspozoni, so pri človeku LINE-2 prisotni v obliki okvarjenih kopij (12). Največ študij je bilo narejenih na LINE-2 retrotranspozoma iz rib, imenovanih UnaL2 in ZfL2. Predpona Una izvira iz japonskega imena *unagi*, kar pomeni jegulja (13). Predpona Zb pa izhaja iz imena *Zebrafish* in se nanaša na vrsto ribi cebrica (14). Oba LINE-2 retrotranspozona iz rib imata le en odprt bralni okvir, ki nosi zapis za reverzno transkriptazo in endonukleazo (13, 15) (Slika 2). Obe regiji (RT in EN) sta nujno potrebni za retrotranspozicijo LINE-2 retrotranspozonov. Za retrotranspozicijo pa je pomemben tudi del na 3' koncu LINE-2 retrotranspozonov. Mutacije na 3' delu retrotranspozona UnaL2 močno zmanjšajo pogostost retrotranspozicije. UnaL2 nosi v 3' delu več ponovitev zaporedja $[TGTAA]_n$. Več kot je teh ponovitev, večja je učinkovitost retrotranspozicije (13). Učinkovitost retrotranspozicije je pri retrotranspozonu ZfL2 približno 30-krat večja kot pri UnaL2 (14).



Slika 2: Shematski prikaz ZfL2 retrotranspozona. ZfL2 je dolg približno 4,2 kilobaznih parov (kb) in ima en sam ORF. Protein, za katerega nosi zapis ORF ZfL2 retrotranspozona, sestoji iz domene za endonukleazo (EN) in reverzno transkriptazo (RT) (15).

1.1.3 Mehanizem retrotranspozicije

LINE retrotranspozoni ne kodirajo integraze tako kot LTR-retrotranspozoni, zato se njihov način retrotranspozicije razlikuje od ostalih retrotranspozonov. Za pomnoževanje uporabljajo reverzno transkripcijo, pri kateri reverzna transkriptaza uporabi tarčno mesto na kromosomalni DNA kot začetni oligonukleotid. LINE-1 vsebuje gen, ki kodira protein, potreben za premik retrotranspozona na novo lokacijo v genomu. Na začetku se LINE-1 v procesu transkripcije prepiše v informacijsko RNA (messenger RNA, mRNA). Informacijska RNA nato potuje iz jedra v citoplazmo, kjer poteče translacija v proteina ORF1 in ORF2. Protein ORF1 je potreben za vezavo mRNA, protein ORF2 pa ima aktivnost encimov reverzne transkriptaze in endonukleaze. Nato ORF2 in pripadajoča mRNA molekula preide nazaj v jedro, kjer poteče reverzna transkripcija molekule mRNA v komplementarno DNA (cDNA). Komplementarna DNA se na koncu integrira na novo lokacijo v genomu (16) (*Slika 3*). Natančen mehanizem retrotranspozicije žal še ni poznan.



Slika 3: Potek retrotranspozicije pri LINE-1 retrotranspozonu. V jedru celice poteka transkripcija DNA LINE-1 retrotranspozona v mRNA, ki v nadaljevanju procesa potuje v citoplazmo. V citoplazmi se v procesu translacije tvorijo proteini ORF. Oba ORF1 sta potrebna za vezavo mRNA, ORF2 pa predstavlja reverzno transkriptazo in endonukleazo. ORF2 skupaj z mRNA potuje nazaj v jedro, kjer poteče reverzna transkripcija mRNA v cDNA. Novo nastala cDNA se na koncu vključi na novo mesto v genomu (17).

1.1.4 Vpliv retrotranspozonov na genomsko stabilnost

Pri retrotranspoziciji se število kopij retrotranspozona poveča, kar lahko vodi v spremembo velikosti genoma. Vsi retrotranspozoni s svojim načinom replikacije povzročijo insercijsko mutagenezo, lahko pa povzročijo inaktivacijo gena ali vplivajo na izražanje genov (18). Mutacije, povzročene z retrotranspozoni, so zaradi načina retrotranspozicije »kopiraj in prilepi« zelo stabilne, saj se zaporedje na insercijskem mestu ohrani (19). Insercijska mutageneza je pogosto vzrok za različne genetske bolezni, kot so hemofilija A, mišična distrofija in druge (20, 21). LINE-1 elementi lahko povzročijo tudi raka debelega črevesa, kar kaže na to, da se LINE-1 retrotranspozicija ne pojavi le v zarodnih celicah, ampak tudi v somatskih celicah (22).

LINE retrotranspozoni lahko popravijo pretrganje dvostranske DNA z insercijo samih sebe v genom preko procesa, ki ni odvisen od endonukleaze. Pojavu pravimo *cis* učinek in je odgovoren za veliko število mutacij (insercij) pri človeku (18). LINE retrotranspozoni lahko poleg svojega zaporedja prenesejo tudi neko drugo DNA iz njihovega 3' konca na novo lokacijo v genomu. Ta proces se imenuje 3' transdukcija (23). Na ta način posredujejo retrotranspozicijo neavtonomnih SINE retrotranspozonov (24). SINE retrotranspozoni uporabijo reverzno transkriptazo ozziroma endonukleazo LINE retrotranspozonov ter si tako omogočijo retrotranspozicijo (23).

1.1.5 Uporaba retrotranspozonov

Retrotranspozone lahko uporabimo za doseganje insercijske mutageneze v živalskih modelih ali za utišanje genov. Razvoj mutageneze pri živalih je zelo uporaben pri pripravi živalskih modelov (npr. podgan, miši) s človeškimi boleznimi. Pri pripravi LINE-1 transgenih živali za mutagenezo je pomembno upoštevati določene faktorje, kot so aktivnost retrotranspozona (le nekaj izmed 80-100 jih je, ki imajo zelo visoko učinkovitost), tip retrotranspozicijske kasete za detekcijo mutacij, jakost in tkivna specifičnost promotorja, ki je gonilo transkripcije LINE-1 in genetska zasnova živalskega modela (17). Uporaba LINE-1 retrotranspozonov pri insercijski mutagenezi ima določene prednosti v primerjavi z uporabo retrovirusov:

1.) Retrotranspozoni se lahko uporabijo za dostavo genske zanke, ki se učinkovito spoji z geni in moti njihovo funkcijo. To pomeni, da do 30% insercij (odstotek genoma, ki vsebuje genske eksone in introne) lahko zmoti delovanje gena. To predstavlja velik napredok v

primerjavi z kemijsko povzročenimi mutagenezami, ki povzročajo točkovne mutacije, katere pogosto sploh ne vplivajo na funkcijo gena. Insercije, nastale zaradi LINE-1, so trajne in stabilne, torej ni možnosti, da bi se mutacije čez čas izgubile (25).

2.) LINE-1 insercije niso mestno specifične temveč naključne. Najdemo jih na vsakem kromosomu tako v intronih kot tudi v DNA regijah z nizko ali visoko vsebnostjo gvanin-citozin (GC) (26).

3.) LINE-1 niso omejeni z številom mutacij, ki jih lahko povzročijo, saj se prenašajo preko mehanizma »kopiraj in prilepi«. Mutageneza, povzročena z njimi, ima zelo visoko frekvenco mutacij, kar omogoča doseganje idealnega stanja – ena mutacija na vsako zarodno celico. Tako se lažje ugotovi, katere mutacije so povezane s fenotipom (17, 27).

4.) Nove lokacije, kjer je prišlo do insercije v genomu se dajo enostavno detektirati s pomočjo inverzne verižne reakcije s polimerazo (polymerase chain reaction, PCR) (17).

5.) Direktne mutacije v zarodnih celicah se prenašajo na potomce po naravnji poti. Tako lahko učinkovito vzredimo živali, ki vsebujejo okvarjene gene. To je pomembno, saj je uporaba embrionalnih celic draga, časovno potratna in tehnično neizvedljiva v večini živalskih sesalskih modelov (28).

LINE retrotranspozone uporabljajo tudi kot vektorje v genski terapiji. Genska terapija je poseg, pri katerem se v celico vnese gen za nadomestilo, spremembo ali utišanje izražanja genov. Njen cilj je zdravljenje podedovanih ali pridobljenih genetskih bolezni. Za vnos gena v celico potrebujemo vektor.

1.1.6 Obrambni mehanizmi organizmov na retrotranspozicijo

Potreba po genomski stabilnosti pri evkariontih je privedla do razvoja številnih strategij za zmanjšanje proliferacije elementov, sposobnih transpozicije. Te strategije vključujejo:

- utišanje transkripcije preko metilacije DNA in/ali modifikacije kromatina
- post-transkripcijsko utišanje RNA preko RNA interference
- inaktivacijo elemetov preko mutacij, do katerih pride med ciklom retrotranspozicije, s pomočjo celičnih citidinskih deaminaz (29).

1.2 PROTEINI APOBEC3

Proteini APOBEC3 (apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide 3) so po delovanju encimi, in sicer citidinske deaminaze. Sodijo v družino proteinov APOBEC, v katero vključujemo tudi proteine AID, APOBEC1, APOBEC2 in APOBEC4. Geni, ki nosijo zapis za proteine APOBEC3 se pri človeku nahajajo na kromosomu 22 in so značilni za sesalce. Med evolucijo sesalcev se je genski lokus z duplikacijo razširil iz enega gena pri miših (mA3) na sedem genov pri primatih (od A3A do A3H) (30-32).

Vsi proteini APOBEC3, z izjemo A3H, kažejo protivirusni učinek proti mnogim virusom (npr. HIV, SIV, MLV, HTLV, hepatitis B in AAV), inhibirajo pa tudi LTR in non-LTR retrotranspozone. Pomanjkanje protivirusnega učinka pri A3H je verjetno posledica njegove nizke ekspresije v celicah (33, 34). Najprej so odkrili inhibitorni učinek A3G na replikacijo virusa HIV (35). Nato je sledilo odkritje vseh sedem članov družine APOBEC3 za katere imamo zapis v človeškem genomu. Poimenovali so jih A3A, A3B, A3C, A3DE (3D in 3E gena kodirata vsak posebej N- in C-terminalni domeni 3DE proteina), A3F, A3G in A3H (36).

1.2.1 Mesta izražanja proteinov APOBEC3 pri sesalcih

Proteini APOBEC3 so se verjetno razvili, da bi preprečili nestabilnost genoma, ki jo povzročajo endogeni retroelementi (retrotranspozoni). Protein APOBEC naj bi imeli v organizmu vretenčarjev dvojno vlogo - kot naravna imunska obramba in kot sprožilec protitelesnega odgovora (33). Pri človeku jih najdemo v vranici, limfocitih v periferni krvi, ovarijih, testisih ter mnogih drugih tkivih (*Tabela I*).

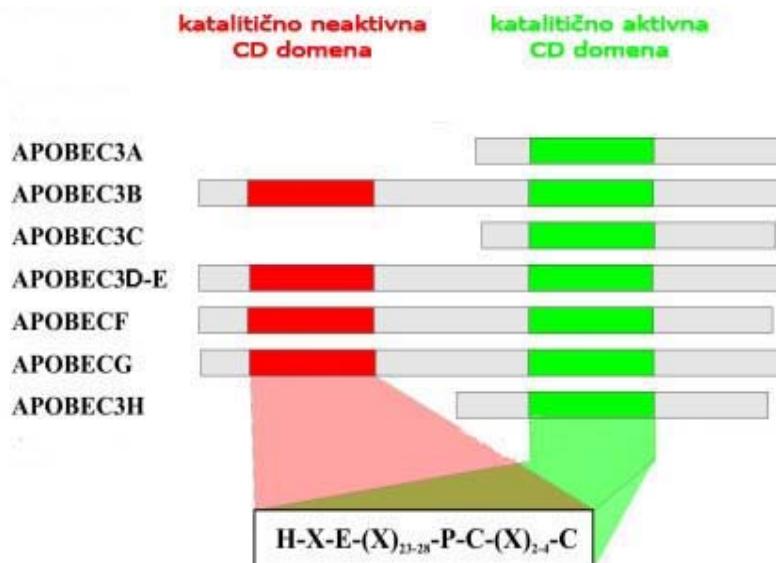
Tabela I: Mesta nahajanja nekaterih proteinov APOBEC v organizmu. J=jedro; C=citoplazma; J/C=premikanje iz jedra v citoplazmo ali iz citoplazme v jedro (31)

PROTEIN APOBEC3	EKSPRESIJSKI PROFIL	SUBCELIČNA LOKALIZACIJA
A3A	Keratinociti, vranica, tanko črevo, monociti, makrofagi, kolorektalni adenokarcinom, kronična mieloična levkemija, Burkittov limfom	J/C
A3B	Keratinociti, debelo črevo, tanko črevo, testisi, ovariji, zarodne celice, pljučni karcinom, kolorektalni adenokarcinom, Burkittov limfom, kronična mieloična levkemija	J
A3C	Veliko tkiv in različne rakave celične linije	J/C
A3DE	Mnogo tkiv	J/C
A3F	Mnogo tkiv, verjetno na enakih mestih kot A3G	C
A3G	Primarno izražen v limfoidnih in mieloidnih celičnih linijah, timus, tonzile, kostni mozeg, testisi, ovariji, maternica, možgani, srce, pljuča, jetra, ledvica, vranica, pankreas, kolorektalni adenokarcinom, Burkittov limfom	C
A3H	Periferni limfociti v krvi, testisi, ovariji, jetra zarodka, koža, mali možgani, debelo črevo, tanko črevo	J/C

1.2.2 Struktura proteinov APOBEC3

Vsi proteini APOBEC3 imajo značilno strukturo. Domeni v obliki α -vijačnice sledi katalitična domena (CD), kratek peptid kot povezovalec in psevdokatalitična domena (PCD). Pri A3B, A3DE, A3F in A3G se celotna enota še enkrat ponovi, tako da se tvori struktura vijačnica1-CD1-povezovalec1-PCD1-vijačnica2-CD2-povezovalec2-PCD2. Tako imajo proteini A3B, A3DE, A3F in A3G dve katalitični domeni, ki sta ključni za delovanje in zato tudi približno dvakrat večjo maso kot ostali proteini APOBEC3. Pri proteinih APOBEC3 z dvema deaminznima domenama (CD1 in CD2) je običajno katalitično aktivna le ena, medtem ko druga sodeluje pri vezavi na nukleinsko kislino (RNA) in vgrajevanje v virion pri okužbi z retrovirusi. Vsaka od CD vsebuje ohranjen motiv

aminokislinskega zaporedja His-X-Glu-(X)₂₇₋₂₈-Pro-Cys-(X)₂₋₄-Cys, pri čemer X predstavlja katerokoli aminokislino. Histidinski (His) in dva cisteinska (Cys) ostanka v zaporedju koordinirata Zn²⁺ ion, ki je nujen za katalitično aktivnost. Glutaminski (Glu) ostanek pa je vključen v protonski premik med reakcijo deaminacije, saj pomaga pri tvorbi hidroksidnega (OH⁻) iona, ki je potreben za izstop amino (NH₂) skupine (37) (*Slika 4*).



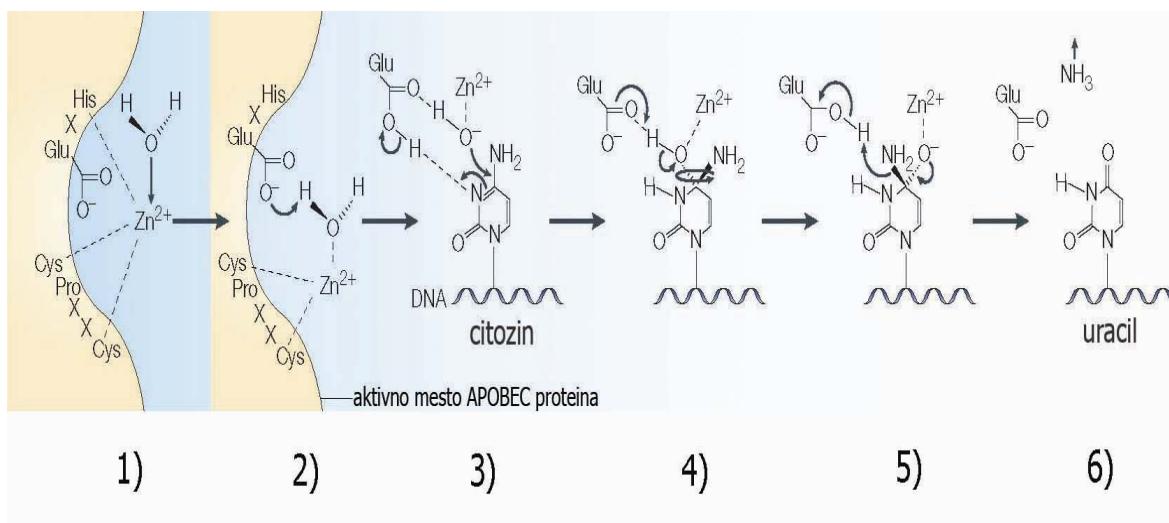
Slika 4: Struktura proteinov APOBEC3 pri človeku. Proteini APOBEC3 vsebujejo eno ali dve katalitični domeni (CD). Proteini A3A, A3C in A3H vsebujejo eno katalitično domeno, ostali predstavniki proteinov APOBEC3 pa dve. Katalitično aktivna domena je označena z zeleno barvo, katalitično neaktivna domena pa z rdečo barvo. Vsaka CD ima značilno aminokislinsko zaporedje: His-X-Glu-(X)₂₇₋₂₈-Pro-Cys-(X)₂₋₄-Cys. His in oba Cys ostanka v zaporedju koordinirata Zn²⁺ ion, ki je nujen za katalitično aktivnost, Glu pa pomaga pri tvorbi OH⁻ iona, ki je potreben za izstop amino skupine (32).

A3G se pri človeku nahaja v dveh oblikah: visokomolekularna oblika A3G (HMM) in nizkomolekularna oblika (LMM). LMM je encimsko aktivna, medtem ko je HMM neaktivna oblika proteina. HMM se lahko pretvori v LMM obliko z RNazo A (38).

1.2.3 Delovanje proteinov APOBEC3 na retroviruse

Protiretrovirusno delovanje proteinov APOBEC3 se kaže z inhibicijo retrovirusne replikacije. Njihova encimska aktivnost in druge manj poznane neencimatske aktivnosti jim omogočajo, da povzročijo intrinzično blokado HIV-1 in drugih patogenov. V celicah,

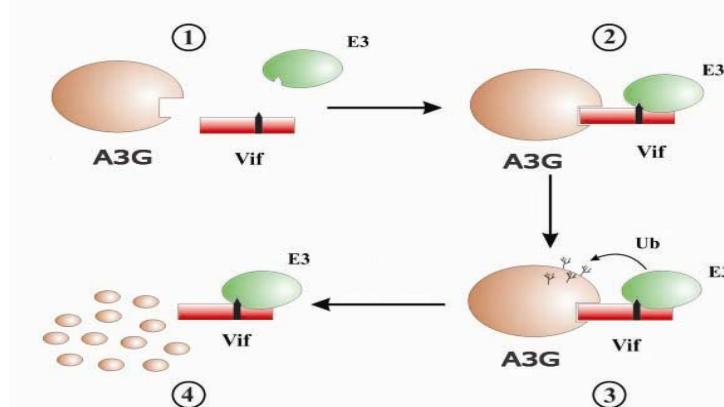
okuženih z virusom HIV, se proteini APOBEC3 vgradijo v virione. Virioni se izločijo iz celic in napadejo nove celice, kjer proteini APOBEC3 inhibirajo retrovirusno replikacijo v novo okuženih celicah. V okuženih celicah delujejo tako, da med reverzno transkripcijo retrovirusov deaminirajo citozin (C) v uracil (U) na negativni verigi cDNA intermedijatov (Slika 5). Virusna reverzna transkriptaza prepozna U kot timin (T), kar vodi v vključevanje adenina (A) namesto gvanina (G) v novo sintetizirano verigo DNA. Posledica deaminacije je blokiranje virusne replikacije s spodbujanjem akumulacije mutacij iz gvanina v adenin (G v A) na pozitivni verigi cDNA virusa. Vsi proteini APOBEC3 so sposobni razlikovati med obema verigama DNA, saj deaminacija poteka na negativni verigi, mutacije pa se pojavijo na pozitivni verigi. Mutacije vsaj ene katalitične domene pri proteinih APOBEC3 ne izničijo njegovega inhibitornega delovanja na replikacijo virusa HIV-1. To pomeni, da proteini APOBEC3 delujejo tudi po nekem drugem mehanizmu, ki ni odvisen od njihove deaminazne aktivnosti (19, 33-35, 39, 40).



Slika 5: Predviden mehanizem reakcije deaminacije citozina v uracil, povzročene s proteini APOBEC3. 1) Histidinski (His) in cisteinska (Cys) ostanka v aktivnem mestu proteina APOBEC3 koordinirata Zn^{2+} ion; prikazana je molekula vode (H_2O), ki vstopa v reakcijo 2) Ko H_2O reagira z glutaminsko kislino (Glu) in Zn^{2+} ionom, se tvori hidroksidni ion (OH^-) 3) Glu protonira N3 pirimidinskega obroča molekule citozina, kar povzroči destabilizacijo dvojne vezi N3-C4 in omogoči C4, da postane dovzet za napad OH^- iona 4) To vodi v tvorbo tetraedičnega intermedijata, Glu pa veže proton (H^+) molekule vode 5) Amino skupina (NH_2) prejme ta proton v rekaciji, ki povzroči cepitev vezi C-N in tvorbo dvojne vezi C4-O 6) Z aktivnega mesta proteina APOBEC3 se sprostita uracil in amoniak (NH_3) (33).

Proteini APOBEC3 se lahko vključijo v virion preko združitve z virusno RNA. Proses je mestno specifičen glede na naravo proteina APOBEC3. Takega mehanizma delovanja ni zaslediti pri A3A, saj ne povzroči mutacij G v A, čeprav sprememba aktivnega mesta pri proteinu prekine njegovo inhibitorno aktivnost. Sama deaminacija ni niti nujen niti zadosten vzrok za ustrezno protivirusno aktivnost. Največje število mutacij G v A v cDNA retrovirusov povzročita proteina A3F in A3G (19, 34).

Žal pa je virus HIV-1 razvil proti proteinu APOBEC3 obrambo v obliki virusnega infektivenga faktorja (virion infectivity factor, Vif). Protein Vif prepreči delovanje proteina APOBEC3, saj se veže na protein in povzroči njegovo razgradnjo. Za razgradnjo proteina A3G je potrebna tvorba Vif-Cul5-podaljška B in kompleksa C-Rbx1, ki omogoča poliubikvitinacijo proteina A3G (*Slika 6*). Možno je tudi, da Vif moti translacijo proteina A3G ali kar direktno njegovo vključevanje v virion. Razgradnja proteina, povzročena z Vif, je najbolj učinkovita pri proteinu A3G, pri proteinih A3F in A3DE nekoliko manj, na A3B pa Vif nima učinka. Učinkovitost Vif na posamezne proteine APOBEC3 je specifična za določene vrste organizmov (npr. človek, šimpanz), pri drugih vrstah (npr. miših) pa Vif ni učinkovit (41-43).



Slika 6: Prikaz razgradnje proteina A3G po vezavi na protein Vif. 1) Protein Vif vsebuje vezavni mesti za A3G in Cul5-E3 ligazni kompleks. 2) Ekspresija Vif povzroči nastanek trojnega kompleksa A3G-Vif-E3. 3) Nastanek kompleksa sproži ubikvitinacijo A3G. 4) Ubikvitinacija vodi v razgradnjo proteina A3G (32).

Proteini APOBEC3 nimajo učinka le na številne retroviruse, temveč tudi na nekatere druge viruse (*Tabela II*).

Tabela II: Prikaz inhibitornega učinka vseh predstavnikov proteinov APOBEC3 na eksogene viruse. SIV (opičji imunodeficientni virus), HTLV(človeški T-limfocitni virus), MLV (mišji virus levkemije), EIAV (konjski infekcijski virus anemije), PFV (opičji penasti virus), RSV (Rousov sarkoma virus), HBV (virus hepatitis B) in AAV (adeno-asociacijski virus). A3B, A3DE, A3F in A3G kažejo močno učinkovitost proti virusu HIV-1 v odsotnosti proteina Vif, medtem ko je učinkovitost A3C v odsotnosti Vif zelo majhna. Največji inhibitorni učinek na virus HIV-1 imata A3F in A3G skupaj, zato v kombinaciji predstavlja glavno obrambo proti omenjenemu virusu (31,36).

humaní APOBEC3	eksogeni vírusi								
	retrovírusi					ostali			
	HIV-1 nar ni Vif	HIV-2 ni Vif	SIV-1 ni Vif	HTLV ni Vif	MLV ni Vif	EIAV ni Vif	PFV	RSV	HBV AAV
3A	-							(+)	+
3B	+	+	+	+	(+)			+	+
3C	(+)		+	+	-		+	(+)	+
3DE	+		+	+	-				-
3F	+		+	+	-		+	+	+
3G	(+)	+	+	+	+	+	+	+	-
3H	-			-					

+, protivírusní učinek (+), blag. protivírusní učinek -, ni učinka ?, nasprotující si rezultáty

1.2.4 Proteini APOBEC3 kot protivírusne učinkovine

Proteini APOBEC3 omogočajo intrinzično imunost na infekcije s tistimi virusi, pri katerih tekom življenskega cikla nastane enoveržna DNA. V primeru infekcije z virusom HIV-1, virusni protein Vif prepreči delovanje proteinom APOBEC3. Protein Vif se veže na protein APOBEC3 in povzroči njegovo razgradnjo. Preprečitev razgradnje APOBEC3 predstavlja eno glavnih možnosti za uporabo proteinov APOBEC3 v protivírusni terapiji. Možnih je več strategij za preprečevanje razgradnje proteinov APOBEC3, ki jih razvrstimo naslednje skupine:

- 1.) Inhibitorji proteina Vif: komponente, ki se vežejo na protein Vif, lahko direktno onemogočijo njegovo delovanje. To bi omogočilo proteinom APOBEC, da izvedejo restrikcijo. Podobno kot klasične anti-HIV terapije, ki so usmerjene direktno proti virusni reverzni transkriptazi ali proteazam, bi lahko ta pristop popustil pod vplivom nastalih mutiranih oblik virusa HIV-1. Visoka stopnja genetskih variacij v retrovírusni populaciji (tudi brez vpliva proteinov APOBEC) bi verjetno izničila ta pristop z nastankom novih variant proteinov Vif, na katere se inhibitorji ne bi več vezali. V kombinaciji z drugimi

protiretrovirusnimi učinkovinami pa bi inhibitorji proteina Vif lahko okrepili obrambo proti reaktivaciji virusa v telesu.

2.) Zaščitniki proteinov APOBEC: retrovirusi (kot npr. HIV-1) so na robu genetskega propada zaradi zelo pogostih mutacij. V primeru, da bi še povečali stopnjo mutacij, bi lahko pripeljali virus do izumrtja. Retrovirusna mutacija z A3G ima za posledico 10 do 1000-kratno povečanje virusnih mutacij v modelni celični kulturi, kar kaže na to, da je možno vrniti virusno nukleinsko kislino v genetsko neaktivno obliko preko deaminacije, odvisne od proteinov APOBEC. V *in vivo* sistemu bi bilo možno pospešiti restrikcijo retrovirusa z uporabo komponente, ki bi zaščitila proteine APOBEC pred proteinom Vif in hkrati ne bi interferirala z njihovo encimsko aktivnostjo. Ta pristop bi imel prednost pred inhibitorji proteina Vif, saj bi bil zaščitnik proteina APOBEC usmerjen v stabilno celično tarčo.

3.) Odstranitev N-terminalne domene proteina A3G: protein Vif prepozna N-terminalno domeno proteina A3G, zato se s tem pristopom izognemo učinku proteina Vif.

4.) Povečanje ekspresije proteinov APOBEC3: gre za povečanje nad stopnjo ekspresije proteina Vif. A3G je prisoten v počivajočih T-celicah v zelo nizki koncentraciji. Aktivacija T-celic s fitohemaglutininom in interlevkinom-2 (IL-2) bistveno poveča stopnjo ekspresije proteina A3G. Za povečanje stopnje ekspresije proteina A3G ali A3F je možna uporaba IL-2, IL-7 in IL-15. Eskpresijo proteinov A3A in A3G poveča zdravljenje makrofagov z INF- α , ekspresijo A3B pa zdravljenje hepatocitov z INF- α .

5.) antagonisti proteina Vif: prvi pristop je uporaba majhnih inhibitornih molekul, ki preprečijo vezavo proteina Vif na A3G in tako preprečijo tudi nadaljnjo razgradnjo A3G. Drugi pristop pa je preprečevanje okrepitve ligaznega kompleksa, kamor se veže protein Vif, z vezavo Culina5 ali Elongina C na protein Vif. Vif bi se kjub temu vezal na A3G in z njim vstopil v nov virion. Ta pristop bi lahko imel nedoločene posledice na protivirusno aktivnost proteina A3G.

6.) Pospeševanje protivirusne aktivnosti proteinov APOBEC3 po vstopu v virion: v počivajočih CD4 T-celicah se nahaja LMM oblika A3G, ki je encimsko aktivna. Po aktivaciji T-celic se LMM oblika A3G pretvorí v neaktivno HMM obliko, zato je pretvorbo potrebno preprečiti (19, 31, 33).

1.2.5 Mehanizem delovanja na retrotranspozone

Proteini APOBEC3 inhibirajo retrotranspozicijo LTR- in non-LTR retrotranspozonov (44-46) (*Tabela III*). Študije inhibitornega učinka proteinov APOBEC3 na retrotranspozicijo se med seboj zelo razlikujejo, saj na rezultat eksperimenta vplivajo različni dejavniki.

Tabela III: Prikaz inhibitornega učinka vseh predstavnikov proteinov APOBEC3 na retrotranspozone.

IAP: mišji endogeni retrovirus; proteini A3A, A3B in A3C imajo inhibitorni učinek na LINE-1 retrotranspozone, A3DE, A3G in A3H pa ne inhibirajo LINE-1 retrotranspozicije. V primeru proteina A3F, si rezultati različnih študij nasprotujejo (36).

humaní APOBEC3	endogeni retroelementi				
	LTR-transpozoni			non-LTR transpozoni	
	IAP	musD	Ty1	LINE1	Alu
3A	+	+	+	+	+
3B	+	-?		+	+
3C	+	-?	+	+	+
3DE				-	
3F	+	+	+	+?	-
3G	+	+	+	-	+
3H				-	

+, protivirusni učinek (+), blag protivirusni učinek -, ni učinka ?, nasprotujuči si rezultati

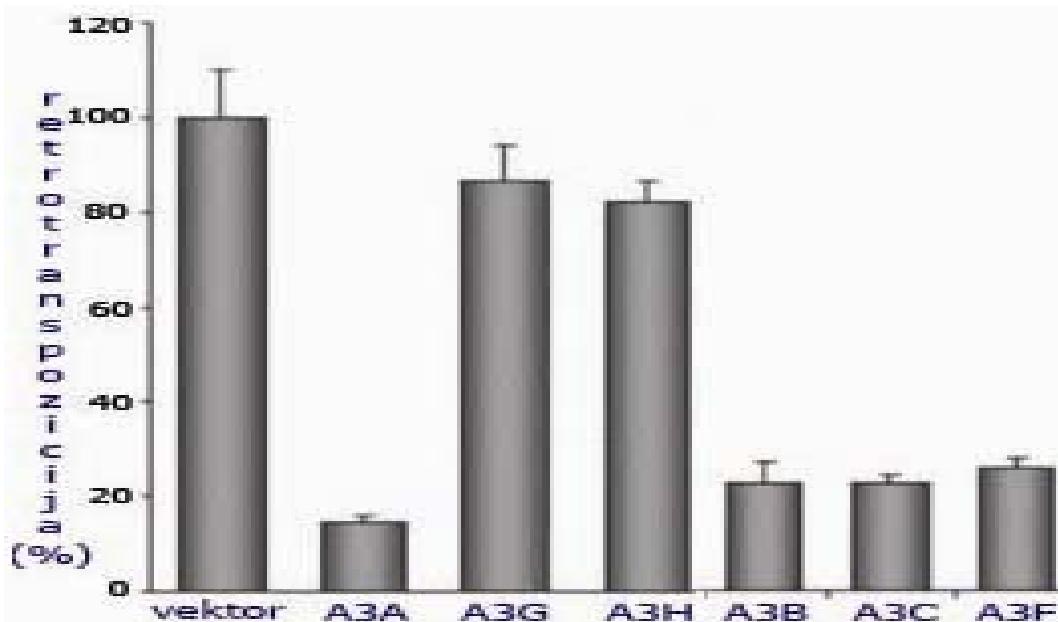
Proteini APOBEC3 delujejo na LTR retrotranspozone tako, da se vanje vključijo, podobno kot se pri retrovirusih vključijo v virion. Primarni cilj infekcijskih retrovirusov je pomnoževanje v gostitelju in tako ostati funkcionalen invaziven element. Endogeni elementi pa so že prisotni v genomu gostitelja kot geni, ki se množično kopirajo, vendar jih je večina neaktivnih. Proteini APOBEC3 inhibirajo retrotranspozicijo LTR retrotranspozonov po enakem mehanizmu kot pri retrovirusih, preko deaminacije citozina v uracil. Posledica deaminacije je visoka raven mutacij G v A v kopijah LTR retrotranspozonov. Najbolj potencialna inhibitorja LTR retrotranspozona IAP (intracisternal A-particle, mišji endogeni retrovirus) sta proteina A3A in A3B. Mutacija aktivnega mesta proteina A3A ne izniči njegove sposobnosti za inhibicijo IAP retrotranspozicije, kar pomeni da predstavlja A3A nov mehanizem za inhibicijo funkcije retrotranspozona (44, 47).

Proteini APOBEC imajo dvojni učinek na retrotranspozone:

- zmanjšajo število kopij cDNA retrotranspozona preko nedeaminacijskega načina
- inaktivirajo nastale cDNA preko mutacij, ki jih povzročijo z deaminacijo.

Pomembnejši učinek je tisti, ki zmanjša število kopij retrotranspozicije, katerih integracija lahko direktno vodi v insercijsko mutagenezo. Dvojni učinek proteinov APOBEC3 inaktivira kopije retrotranspozonov za poznejše retrotranspozicije (47).

Proteini APOBEC3 povečini inhibirajo tudi retrotranspozicijo non-LTR retrotranspozona LINE-1. Proteini A3A, A3B, A3C in A3F so najbolj učinkoviti inhibitorji LINE-1 retrotranspozicije, medtem ko A3G in A3H učinkujeta najmanj inhibitorno na ta proces (*Slika 7*). Za delovanje proteina A3F sta pomembna dva aminokislinska ostanka (108 in 231), saj se ob spremembi teh dveh ostankov bistveno zmanjša inhibitorna sposobnost proteina. Večina študij nakazuje, da A3G nima učinka oziroma je manj učinkovit inhibitor retrotranspozicije LINE-1. Kombinacije različnih proteinov APOBEC3 delujejo bistveno bolj inhibitorno kot posamezen protein. Proteini A3A, A3B, A3C in A3F so skupaj zelo učinkoviti inhibitorji LINE-1 retrotranspozicije, medtem ko ima kombinacija proteinov A3G, A3H in A3DE zelo majhen učinek na ta proces. Inhibitorni učinek A3B je zelo vezan na aktivno mesto (katalitično domeno) proteina, medtem ko inhibicija pri A3A ni odvisna od aktivnosti katalitične domene. V kopijah LINE-1 retrotranspozonov proteini APOBEC3 ne povzročijo mutacij G v A. Možno je, da med reverzno transkripcijo enoverižna DNA ni na voljo za deaminacijo. Proteini APOBEC3 verjetno delujejo inhibitorno na LINE-1 retrotranspozicijo po nekem drugem mehanizmu, neodvisno od katalitičnih domen (29, 47, 48).



Slika 7: Prikaz inhibitornega učinka proteinov APOBEC3 na retrotranspozicijo LINE-1 retrotranspozonov. Prazen vektor nima inhibitornega učinka (100% retrotranspozicija), posamezni proteini APOBEC3 pa imajo različen inhibitorni učinek (največji pri A3A, najmanjši pri A3G) (29).

2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen diplomske naloge je preveriti ali proteini APOBEC3 preprečijo retrotranspozicijo LINE-2 retrotranspozonom in ugotoviti, kateri proteini APOBEC3 pri tem sodeljujejo. Ker je encimska aktivnost proteinov APOBEC3 odgovorna za preprečevanje razmnoževanja nekaterim virusom in retrotranspozonom, želimo preverili ali proteini APOBEC3 povzročijo mutacije v na novo vključenih LINE-2 retrotranspozoni.

Preverili bomo naslednji hipotezi, ki temeljita na raziskavah z LINE-1 retzrotranspozoni:

Hipoteza 1: Proteini APOBEC3 povečini inhibirajo proces retrotranspozicije ZfL2

retrotranspozona

- Plazmid, ki nosi zapis za določen protein APOBEC3 in plazmid, ki nosi označen ZfL2 retrotranspozon, bomo kotransfircirali v sesalske celice Hela
- S selekcijo z geneticinom bomo določili hitrost retrotranspozicije ZfL2 retrotranspozona v prisotnosti proteinov APOBEC3

Hipoteza 2: Proteini APOBEC3 v kopiji ZfL2 retrotranspozona ne povzročajo mutacij G v A

- Plazmid, ki nosi zapis za določen protein APOBEC3 in plazmid, ki nosi označen ZfL2 retrotranspozon, bomo kotransfircirali v sesalske celice Hela
- S selekcijo s higromicinom bomo ločili celice, ki so sprejele retrotranspozona
- Iz sesalskih celic bomo izolirali genomsko DNA in s PCR reakcijo pomnožili fragment na novo vključenega označenega retrotranspozona (regijo *neo*), v katerem bomo iskali mutacije
- S primerjavo zaporedja regije *neo* na novo vključenega retrotranspozona ZfL2 in zaporedjem *neo* pred retrotranspozicijo bomo iskali morebitne mutacije iz gvanina v adenin

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

<u>Agaroza</u>	Serva, Nemčija
<u>Akrilamid / bisakrilamid (30% / 0,8% raztopina)</u>	Fluka, Švica
<u>APS v prahu</u>	Serva, Nemčija
<u>BSA (10 mg/mL)</u>	New England BioLabs, VB
<u>DMEM GlutaMax™-I</u>	Gibco, Invitrogen, ZDA
<u>DPBS (1x koncentrat)</u>	Gibco, Invitrogen, ZDA
<u>Etanol (96%)</u>	Carlo Erba, Italija
<u>FBS (EU Approved Origin)</u>	Gibco, Invitrogen, ZDA
<u>Fiksir za rentgenske filme</u>	Kodak, ZDA
<u>Fugene6® transfeckcijski reagent</u>	Roche, Švica
<u>GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder</u>	MBI Fermentas, Litva
<u>Geneticin®</u>	Gibco, Invitrogen, ZDA
<u>Glicin</u>	Serva, Nemčija
<u>Higromicin B</u>	Invitrogen, ZDA
<u>Ligazni pufer (2x koncentrat)</u>	New England BioLabs, VB
<u>Lumigen™ PS-3 detection reagent (solution A and B)</u>	GE Healthcare, VB
<u>Metanol</u>	Merck, Nemčija
<u>Nanašalni pufer za agarozno elektroforezo (6x koncentrat)</u>	MBI Fermentas, Litva
<u>Natrijev dodecilsulfat</u>	Serva, Nemčija
<u>NEB2 in NEB4 pufra za restriktazi (10x koncentrat)</u>	MBI Fermentas, Litva
<u>Optimem® (1x koncentrat)</u>	Gibco, Invitrogen, ZDA
<u>PBS tablete</u>	Sigma, ZDA
<u>Posneto mleko v prahu</u>	Pomurske mlekarne, Slovenija
<u>Proteazni inhibitor</u>	Sigma, ZDA
<u>Raztopina penicilina in streptomicina</u>	Sigma, ZDA
<u>Razvijalec za rentgenske filme</u>	Kodak, ZDA
<u>SeeBlue® Plus2 Prestained Standard; 1x koncentrat</u>	Invitrogen, ZDA

<u>SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain</u>	Invitrogen, ZDA
<u>T4 ligazni pufer (10x koncentrat)</u>	New England BioLabs, VB
<u>TEMED</u>	Merck, Nemčija
<u>Tripsin/EDTA (0,05% raztopina)</u>	Gibco, Invitrogen, ZDA
<u>Tris</u>	Serva, Nemčija
<u>Tween® 20</u>	Fluka, Švica
<u>X-gal</u>	BioVectra™, Kanada

3.1.2 Topila

deionizirana voda

- deionizirana voda, ki jo pridobivamo z reverzno osmozo in ionsko izmenjavo s pomočjo naprave Millipore Special

3.1.3 Reagenti

APS (10% raztopina)

- 10 g APS v prahu
- dopолнемо z dH₂O do 100 mL

Etanol (70%)

- 70 mL 96% etanola
- dopолнемо z dH₂O do 100 mL

Geneticin

- raztopina geneticina (50 mg/mL)
 - 1,398 g geneticina v prahu (aktivnost 71,5%)
 - 20 mL dH₂O
 - filtracija

Tris-Cl/SDS pufer, pH 8,8 (4x koncentrat)

- za 500 mL pufra
 - 90,7 g 1,5 M Tris-Cl
 - ~490 mL dH₂O
 - nekaj kapljic HCl za uravnavanje pH do 8,8
 - filtriramo

Tris-Cl/SDS pufer, pH 6,8 (4x koncentrat)

- za 500 mL pufra
 - 30 g 0,5 M tris-Cl
 - ~ 450 mL dH₂O
 - ~ 20 mL HCl za uravnavanje pH do 6,8
 - 2 g 40,4 % NaDS
 - filtriramo

RIPA pufer

- 150 mM NaCl
- 0,1% NaDS
- 1% NP-40 ((oktilfenoksi)polietoksietanol)
- 50 mM Tris-Cl (pH 7,6)

3.1.4 Raztopine in geli

Agarozni gel (1% raztopina)

- 0,8 g agaroha
- 80 mL 1x TAE pufer
- 8 µL SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain

Blokirna raztopina (5% raztopina)

- 5 g posnetega mleka v prahu
- 100 mL DPBS

Koncentracijski gel za NaDS-PAGE

- | | |
|---|---------|
| ▪ Akrilamid / bisakrilamid (30% / 0,8%) | 650 µL |
| ▪ 4x Tris-Cl/SDS pufer, pH 6,8 | 1,25 mL |
| ▪ dH ₂ O | 3,05 mL |
| ▪ 10% APS | 25 µL |
| ▪ TEMED | 5 µL |

NaDS pufer (1x koncentrat)

- 100 mL 10x NaDS pufra
- dopolnemo z dH₂O do 1 L

NaDS pufer (10x koncentrat); pH 8,3

- 30,2g Tris baze

- 144 g glicina
- 10 g NaDS
- dopolnemo z dH₂O do 1L

Nanašalni pufer za NaDS-PAGE (6x koncentrat)

- 0,2% bromfenolmodro
- 20% glicerol
- 0,4% NaDS
- 3,1 % DTT (ditiotreitol)

PBS (1x koncentrat)

- 2 PBS tableti
- 400 mL dH₂O

PBST (0,05% raztopina)

- 250 µL Tween® 20
- 500 mL DPBS

Pufer za prenos

- 100 mL 10x NaDS pufra
- 200 mL metanola
- 700 mL dH₂O

Raztopina primarnih protiteles anti-myc in anti-HA (1:2000)

- 10 µL primarnih protiteles anti-myc ali anti-HA
- 20 mL blokirne raztopine

Raztopina sekundarnih protiteles (1:5000)

- 4 µL sekundarnih protiteles
- 20 mL blokirne raztopine

Separacijski gel za NaDS-PAGE

- | | |
|---|---------|
| ▪ Akrilamid / bisakrilamid (30% / 0,8%) | 5 mL |
| ▪ 4x Tris-Cl/SDS pufer, pH 8,8 | 3,75 mL |
| ▪ dH ₂ O | 6,25 mL |
| ▪ 10% APS | 50 µL |
| ▪ TEMED | 10 µL |

TAE pufer (1x koncentrat)

- 200 mL TAE pufra (50x koncentrat)
- dopolnemo z dH₂O do 10 L

TAE pufer (50x koncentrat)

- za 1 L pufra
 - 242 g Trisa
 - 57,1 mL ocetne kislina
 - 100 mL 0,5 M EDTA (etilendiaminotetraocetna kislina) pH 8,0
 - dopolnemo z dH₂O do 1 L
 - s HCl uravnamo pH do 7,6-7,8

3.1.5 Encimi

Restriktionske endonukleaze (20,000 U/mL)

- *HindIII, KpnI, NotI, XhoI* New England BioLabs, VB
 - *DpnI, EcoRI* MBI Fermentas, Litva
- T4 ligaza (400,000 U/mL) New England BioLabs, VB
- Taq Master Mix; pufer in Taq polimeraza (2x koncentrat) MBI Fermentas, Litva

3.1.6 Protitelesa

- Primarna mišja monoklonska IgM protitelesa anti-HA Sigma, ZDA
- Primarna mišja monoklonska IgM protitelesa anti-myc Invitrogen, ZDA
- Sekundarna kozja antimišja IgG protitelesa, konjugirana s HRP Dianova, Nemčija

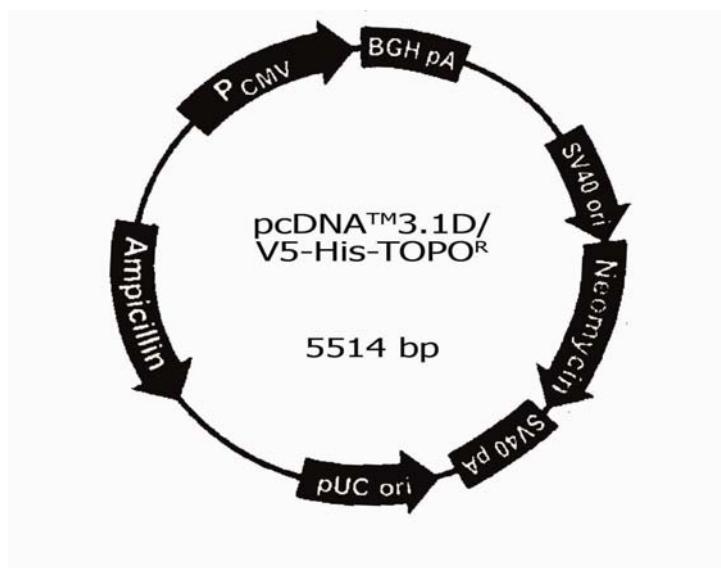
3.1.7 Oligonukleotidi

<u>1808as</u>	CATTGAACAAGATGGATTGCACGC
<u>437s</u>	GAGCCCCTGATGCTCTCGTCC
<u>PGKfor</u>	CAGTTGGAGCTGGAAG
<u>PGKrev</u>	TGCAAATCCAGGGTGCAGTG

3.1.8 Plazmidi in celice

Plazmid pcDNA™ 3.1D/V5-His-TOPO®

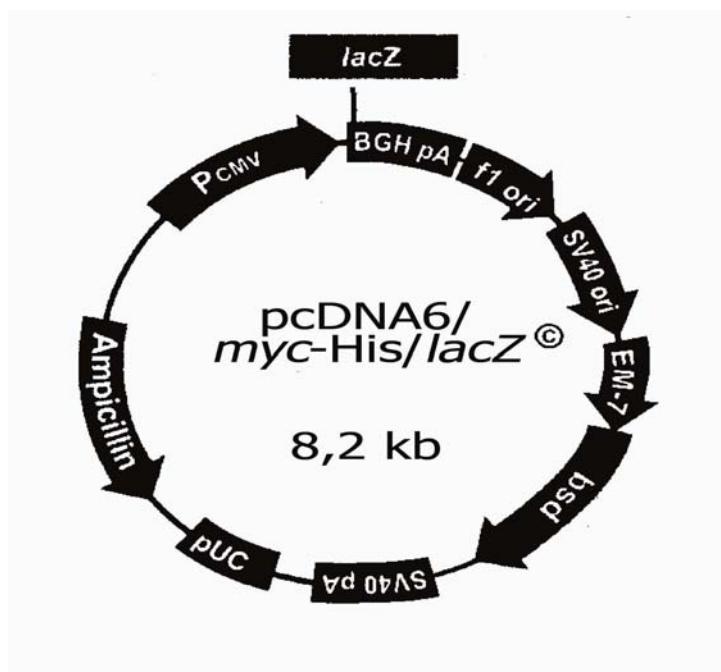
Invitrogen, ZDA



Slika 8: Prikaz vektorja pcDNA3.1D/V5-His-TOPO®

Plazmid pcDNA6/myc-His/lacZ[©]

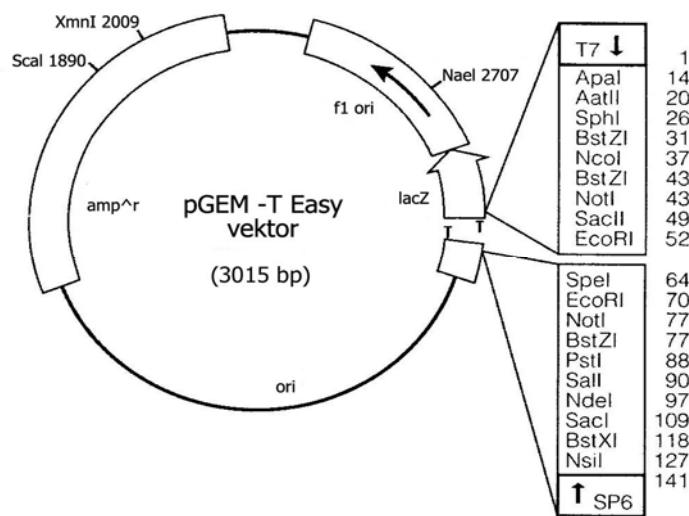
Invitrogen, ZDA



Slika 9: Prikaz vektorja pcDNA6/myc-His/lacZ[©]

Plazmid pGEM®-T Easy

Promega, ZDA



Slika 10: Prikaz vektorja pGEM®-T Easy

Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ kompetentne celice Invitrogen, ZDA

- celice *E. Coli*, sev DH α
 - genotip: F $^-$ $\Phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+)$
 $phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda$

3.1.9 Kompleti

DNeasy® Blood & Tissue Kit

QIAGEN, Nemčija

QIAprep® Spin Miniprep Kit

QIAGEN, Nemčija

QIAquick Gel Extraction Kit

QIAGEN, Nemčija

3.1.10 Laboratorijska oprema

Centrifuga

5415 R (Eppendorf, Nemčija)

Ciklični termostat za PCR

2720 (Applied Biosystems, ZDA)

Filmi

BioMax Light film (Kodak, ZDA)

Inkubator

C 150 (Binder, Nemčija)

Mikroskop

CKX41 (Olympus, ZDA)

<u>Nitrocelulozna membrana</u>	Serva, Nemčija
<u>Spektrofotometer</u>	Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, ZDA)
<u>Stresalnik</u>	Mighty Slim SX 250 power supply (Hoefer, ZDA)
<u>Termoblok</u>	Biometra Ts1 ThermoShaker (Biometra, Nemčija)
<u>UV transiluminator</u>	Visi-Blue™ Transilluminator (UVP, VB)
<u>Vibracijski mešalnik</u>	Bioblock Scientific, Francija
<u>Vlažni inkubator</u>	MCO-18AIC (Sanyo Electric Co, Japonska)

3.2 METODE

3.2.1 Subkloniranje

3.2.1.1 RESTRIKCIJA

Restrikcija je rezanje DNA z restrikcijskimi endonukleazami oziroma restriktazami. Restriktaze so encimi, ki prepozna in cepijo točno določeno nukleotidno zaporedje, običajno dolgo 4-8 nukleotidov (49).

Razrezali smo plazmid pcDNA3.1, ki je vseboval zapis za določen protein APOBEC3. Restrikcijska zmes je vsebovala plazmidno DNA, oba restrikcijska encima (20,000 U/mL, New England BioLabs), 10x pufer NEB2 (MBI Fermentas), 100x goveji serumski albumin (BSA, 10 mg/mL, New England BioLabs) in deionizirano vodo. Restrikcija je potekala 2 uri na 37 °C. Z restriktazami smo cepili tudi vektor pcDNA6-*lacZ*. Plazmide pcDNA3.1-APOBEC3 in pcDNA6-*lacZ* smo razrezali z istimi restriktazami. In sicer, plazmida pcDNA3.1, ki sta vsebovala zapis za proteina A3G in mA3, smo razrezali z restriktazama XhoI in KpnI. Plazmide, ki so vsebovali zapis za proteine A1, A3C in A3F pa smo razrezali z restriktazama HindIII in NotI.

3.2.1.2 AGAROZNA ELEKTROFOREZA

Po restrikciji smo razrezano DNA analizirali z agarozno elektroforezo. Pri agarozni elektroforezi se molekule DNA ali RNA zaradi zamreženosti gela ločujejo le na osnovi velikosti, saj je razmerje med nabojem in dolžino nukleinske kisline pri vseh molekulah enako. Najhitreje potujejo majhne molekule, torej bodo te najnižje na gelu. Običajno smo pripravili 1% agarozni gel za gelsko elektroforezo. Za detekcijo nukleinskih kislin v

agaroznem gelu smo uporabili SYBR® Gold ali Sybr Safe (Invitrogen). Sybr Safe je eden najbolj občutljivih fluorescenčnih barvil za detekcijo dvo- ali enoverižnih DNA ali RNA v elektroforetskih gelih. Sybr Safe smo v razmerju 1 µL na 10 mL gela dodali agaroznemu gelu. Vzorcem smo pred nanosom na gel dodali 6x nanašalni pufer (MBI Fermentas). Elektroforeza je potekala v 1x TAE pufru pri napetosti 90 V in električnem toku 90 mA. Po končani elektroforezi smo gel presvetlili z UV svetlobo in ga fotografirali.

3.2.1.3 IZOLACIJA IZ GELA

Po končani agarozni elektroforezi smo pod UV svetlobo iz gela izrezali DNA fragmente pravilne velikosti. Za izolacijo DNA fragmenta iz gela smo uporabili QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) in fragment izolirali po postopku kot ga priporoča proizvajalec.

3.2.1.4 LIGACIJA

Pri ligaciji se insert in plazmid kovalentno povežeta s pomočjo encima DNA ligaze. Ligirali smo vektor pcDNA6 in insert, ki smo ju razrezali z istima restriktazama. Za ligacijo smo uporabili 50 ng vektorja in trikratno množino inserta. Maso inserta smo izračunali po enačbi:

$$m_{\text{insert}} = 3 \times m_v \times L_{\text{insert}} / L_{\text{vektor}}; \text{ pri čemer je:}$$

- m_v = masa vektorja
- L_{insert} = dolžina inserta
- L_{vektor} = dolžina vektorja

Ligacijska zmes je vsebovala vektor (pcDNA6, razrezan z določenima restriktazama), insert (zapis za protein A3C, A3F, A3G, A1 ali mA3), T4 ligazo (400,000 U/mL, New England BioLabs), T4 10x ligazni pufer (New England BioLabs) in deionizirano vodo. Ligacija je potekala 20 ur pri 16 °C.

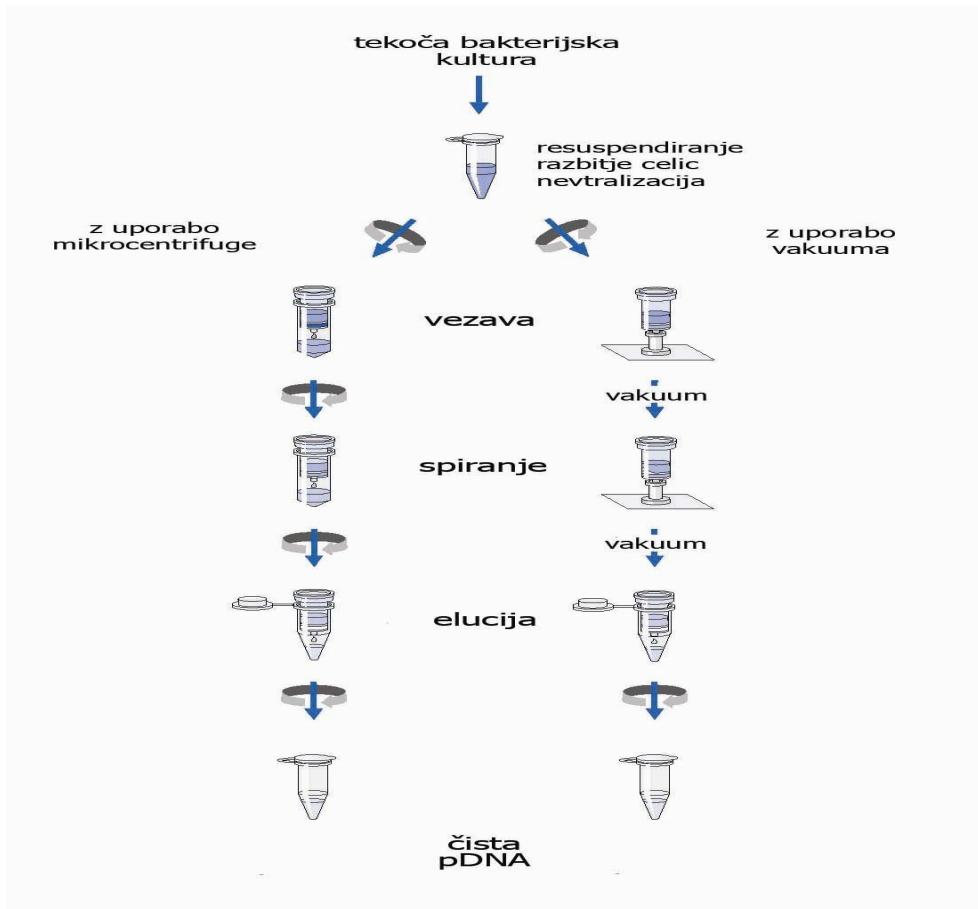
3.2.1.5 TRANSFORMACIJA

Transformacija je vnos tuje DNA v bakterijske celice z namenom pomnožitve tuje DNA. V eksperimentu smo uporabili Subcloning Efficiency™ DH5α™ *E.Coli* kompetentne bakterijske celice (Invitrogen). Na ledu odtaljenim celicam smo dodali 5 µL ligacijske zmesi. Nato smo transformacijsko zmes inkubirali na ledu 30 minut. Uspeh transformacije je običajno zelo nizek, saj večina bakterij plazmida ne sprejme. Po inkubaciji na ledu je

sledil temperturni šok pri 42 °C za 20 sekund in ponovna ohladitev na ledu za 2 minuti. Zmesi smo dodali tekoč LB medij in inkubirali eno uro pri 37 °C in 225 obratih/min. Bakterijske celice smo nato nanesli na segreto trdno gojišče LB z antibiotikom ampicilinom (LBA). Gojišča s celicami smo čez noč inkubirali na 37 °C.

3.2.1.6 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA IZ BAKTERIJSKIH CELIC (MINIPREPARACIJA)

Posamezno bakterijsko kolonijo smo nacepili v 2 mL tekočega LBA medija. Tekoč kulturo smo s stresanjem inkubirali na 37 °C in 225 obratov/min čez noč. Sledila je izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih celic. Uporabili smo QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) ter postopek izvedli po navodilih proizvajalca. Izolacija plazmidov iz bakterijskih celic je temeljila na razbitju celic, nadaljnji vezavi plazmidne DNA na membrano ter na koncu eluaciji vezane DNA z vodo (*Slika II*).



Slika 11: Potek minipreparacije z uporabo QIAprep® Spin Miniprep Kita. Kolonijo bakterijskih celic, ki smo jih čez noč inkubirali v tekočem LBA mediju, smo centrifugirali, nato pa celice resuspendirali v lizirnem pufru, jih nevtralizirali z dodatkom različnih pufrov in prelili v kolone. DNA se je vezala na kolono. Nato smo z dodatkom pufra kolono spirali, da smo odstranili nečistoče, nazadnje pa z dodatkom deionizirane vode eluirali vezano DNA (50).

Izolirano plazmidno DNA smo analizirali z restrikcijo in agarozno elektroforezo. Restriktionska zmes je vsebovala plazmidno DNA, oba restriktionska encima (20,000 U/mL, New England BioLabs), 10x NEB2 pufer (MBI Fermentas), 100x BSA (10 mg/mL, New England BioLabs) in deionizirano vodo. Plazmid, ki nosi zapis za proteina A3G in mA3 smo razrezali z encimoma XhoI in KpnI. Plazmide, ki nosijo zapis za proteine A1, A3C in A3F pa smo razrezali z encimoma HindIII in NotI.

Razrezano DNA smo analizirali z agarozno elektroforezo. Vzorcem smo dodali 6x nanašalni pufer (MBI Fermentas) in jih nanesli na 1% agarozni gel. Elektroforeza je potekla v 1x TAE pufru pri pogojih 90 V in 90 mA. Prisotnost dveh lis na gelu pomeni, da sta se vektor in insert pri ligaciji uspešno združila. V primeru, da plazmid ni sprejel inserta,

bo na gelu le lisa, ki pripada praznemu plazmidu. Ustreznim vzorcem smo na koncu določili nukleotidno zaporedje. Plazmide smo poslali sekvenirati na MWG BIOTECH, v Ebersbergu v Nemčiji.

3.2.2 Delo s celičnimi kulturami

3.2.2.1 293T CELICE

Sesalske 293T celice imajo veliki T-antigen virusa SV40, ki omogoča replikacijo transficiranega plazmida, ki vsebuje SV40 kot mesto začetka pomnoževanja (origin of replication, ORI). T-antigen omogoča veliko število pomnoževanj transficiranega plazmida in podaljšano začasno ekspresijo želenega proteina. Rezultat je velika količina proteina.

3.2.2.2 GOJENJE SESALSKIH CELIC

Pri delu smo uporabljali celično kulturo HEK 293T in HeLa. Celice smo gojili v gojišču, ki smo ga pripravili tako, da smo komercialnemu gojišču DMEM GlutaMax™-I dodali fetusni serum goveda (fetal bovine serum, FBS, EU Origin, Invitrogen) do končne koncentracije 10% (v/v) ter raztopino penicilin/streptomicin (P/S, Invitrogen) do končne koncentracije 1% (v/v). Celice smo gojili v vlažnem inkubatorju pri temperaturi 37 °C in 5% vsebnosti CO₂ v polistirenskih ploščah premera 10 cm z dodatkom 10 mL pripravljenjega gojišča. Potrebo po zamenjavi gojišča oziroma precepitvi celic smo opazili tudi po spremembi barve gojišča iz rdeče v oranžno, saj je ta spremenil pH. Običajno smo gojišče zamenjali s svežim vsakih 48 ur.

3.2.2.3 PRECEPLJANJE CELIC

Če so celice v kulturi preveč namnožene, bo prišlo do odmiranja celic, če pa precepitev izvedemo prezgodaj, bo potrebno več časa, preden se bodo subkulture izrazile (51). Celice smo precepili, ko so dosegle približno 90% konfluenco. Gojišče smo odsesali in celice sprali s majhnim volumnom 1x fosfatnega pufra (DPBS, Invitrogen). V nadaljevanju smo dodali 1 mL 0,05% raztopine tripsin/EDTA (Invitrogen). Sledila je inkubacija za 1-2 minuti pri temperaturi 37 °C in 5% vsebnosti CO₂. Pod mikroskopom smo se prepričali, da so celice res odstopile od podlage. Nato smo dodali majhno količino pripravljenega

gojišča, segretega na 37 °C in 1 mL suspenzije celic prenesli v 10-cm polistirensko ploščo. Vsako ploščo smo dopolnili z gojiščem do končnega volumna 10 mL (redčenje 1:10).

3.2.3 Preverjanje ekspresije proteinov APOBEC3 v sesalskih celicah

Ustreznost ekspresijskih plazmidov, ki nosijo zapis za proteine APOBEC3, smo preverili z izražanjem v sesalskih 293T celicah.

3.2.3.1 TRANSFEKCIJA

Transfekcija je vnos tuje DNA v sesalske celice. V eksperimentu smo DNA vnesli v celice s pomočjo lipidnega kompleksa, ki DNA dostavi v celice po fuziji z membrano ali preko endocitoznih poti. Kot lipidni kompleks (transfekcijski reagent) smo uporabili Fugene6® (Roche). Reagent tvori kompleks z DNA, ki ga transportira v sesalske celice. Kompleks med transfekcijskim reagentom in DNA smo pripravili v Optimem® (Gibco) mediju, ki ne vsebuje seruma. 100 µL medija Optimem® smo dodali 3x volumen transfekcijskega reagenta Fugene6®. Raztopino smo 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Nato smo ji dodali 2 µg plazmidne DNA (preračunan volumen glede na koncentracijo plazmidne DNA). Kot plazmidno DNA smo uporabili plazmid pcDNA6 ali pk vektor, ki nosi zapis za posamezni APOBEC3 protein. Raztopino Optimem® medija, Fugene6® reagenta in rekombinantnega plazmida smo inkubirali 15 minut na sobni temperaturi. Kompleks smo nato po kapljicah dodali celicam 293T v plošči s 6 vdolbinicami. V vsaki vdolbinici je bilo 3×10^5 293T celic v gojišču. Učinkovitost transfekcije smo preverili s transfekcijo plazmida, ki je nosil zapis za zeleni fluorescenčni protein (GFP). 2 dni po transfekciji smo pogledali ekspresijo GFP pod fluorescenčnim mikroskopom in približno ocenili učinkovitost transfekcije.

3.2.3.2 PRIPRAVA LIZATA CELIC

Transficiranim celicam smo odsesali gojišče in jih sprali z 1 mL 1x fosfatnega pufrja (DPBS, Invitrogen). Plošče s celicami smo položili na led, da so bili proteini čimmanj časa izpostavljeni sobni temperaturi, saj pri tej bolje delujejo proteaze, ki bi lahko proteine razgradile. Celice smo nato prenesli v mikrocentrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 1500 obratih/min. Sledilo je resuspendiranje celic v lizirnem pufru (RIPA pufer, ki vsebuje 150

mM NaCl, 0,1% NaDS, 1% NP-40 in 50 mM Tris s pH 7,6) z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI, SIGMA, 1 μ L/mL pufra). Celice iz ene vdolbinice smo lizirali v 200 μ L RIPA pufra in 0,2 μ L PI. Liza je potekala 20-30 minut na ledu z vmesnim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Lizat smo centrifugirali 5 minut pri 14 000 obratih/min. Supernatant smo uporabili za analizo proteinov s prenosom western.

3.2.3.3 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA Z DODATKOM NATRIJEVEGA DODECILSULFATA (NaDS-PAGE)

Pri poliakrilamidni gelski elektroforezi v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS) poteka ločevanje proteinov le na osnovi velikosti. NaDS je anionski detergent, ki proteine denaturira, se nanje nespecifično veže in jim da negativni naboj (49). Pripravili smo poliakrilamidni gel, ki je sestavljen iz dveh delov: separacijski (spodnji) gel in koncentracijski (zgornji) gel. Slednji je manj zamrežen kot separacijski in ne izvaja separacije po velikosti niti ne ovira molekul pri potovanju. Za pripravo obeh delov poliakrilamidnega gela smo uporabili 4x Tris-Cl/SDS pufer s pH 8,8, 4x Tris-Cl/SDS pufer s pH 6,8, 10% amonijev persulfat (APS), tetrametiletilendiamin (TEMED, Merck), raztopino 30% akrilamid/0,8% bisakrilamid (Fluka) ter deionizirano vodo. Razmerje med akrilamidom in biaskrilamidom vpliva na zamreženost gela. Bisakrilamid služi za prečno povezovanje linearnih poliakrilamidnih molekul. Akrilamid pa je monomer, ki ob dodatku bisakrilamida in katalizatorja polimerizira. Katalizator TEMED pospeši kemijsko reakcijo amonijevega persulfata v amonijev radikal. Radikal nato povzroči polimerizacijo akrilamida in bisakrilamida. Vzorce za nanos na gel smo pripravili tako, da smo lizatom dodali 6x nanašalni pufer za NaDS-PAGE ter jih inkubirali 3 minute na 95 °C, s čimer smo dosegli popolno denaturacijo proteinov (tudi porušenje morebitne kvartarne strukture). 6x nanašalni pufer za NaDS-PAGE vsebuje reducent ditiotreitol (DTT), ki prekine disulfidne vezi proteinov v vzorcu. Nato smo vzorce še minuto centrifugirali pri 13 200 obratih/min in 4 °C. Pripravljene vzorce smo nanesli na poliakrilamidni gel. Elektroforeza je potekala pri napetosti 140 V in električnem toku 30 mA.

3.2.3.4 PRENOS WESTERN (WB)

Prenos western se lahko uporablja za detekcijo proteinov. Proteine iz poliakrilamidne gelske elektroforeze smo prenesli na nitrocelulozno membrano s pomočjo električnega

toka. Prenos je potekal uro in pol v pufru za prenos pri 200 mA in 250 V. Membrano smo nato stresali 1 uro pri sobni temperaturi v 5% blokirni raztopini. S tem smo dosegli, da se je vsa nezasedena hidrofobna površina membrane prekrila in se zato kasneje dodana protitelesa niso vezala nanje (49). Za detekcijo proteinov z *myc*-repom smo uporabili primarna mišja monoklonska protitelesa proti *myc*-repu (anti-*myc* protitelesa, Invitrogen). Protein s *HA*-repom pa smo detektirali s primarnimi mišjimi monoklonskimi protitelesi proti *HA*-repu (anti-*HA* protitelesa, Sigma). Membrano, na katero smo prenesli proteine A3C, A3F, A3G, A1 in mA3, smo inkubirali z anti-*myc* protitelesi, membrano, na katero smo prenesli protein A3A pa smo inkubirali z anti-*HA*-protitelesi. Raztopini primarnih protiteles sta bili v razmerju 1:2000. Inkubacija s protitelesi je potekala čez noč pri 4 °C. Po vezavi primarnih protiteles smo membrano med stresanjem spirali 3x po 5 minut z raztopino PBST (0,5% Tween v fosfatnem pufru-PBS). Sledila je vezava sekundarnih kozjih antimišjih poliklonskih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo (Dianova). Raztopina sekundarnih protiteles je bila v razmerju 1:5000. Inkubacija s sekundarnimi protitelesi je potekala 1 uro med rahlim stresanjem. Sekundarna protitelesa so se vezala na konstantno regijo primarnih protiteles. Nazadnje smo membrano sprali 2x po 5 minut z raztopino PBST in 1x po 5 minut s 1x DPBS (Invitrogen). Membrani smo nakapali z raztopino Lumigen™ PS-3 kemiluminiscenčnih substratov A in B (GE Healthcare). Nato smo v temnici na membrano položili film ter oboje vstavili v kaseto ter po 15 minutah ekspozicije razvili film.

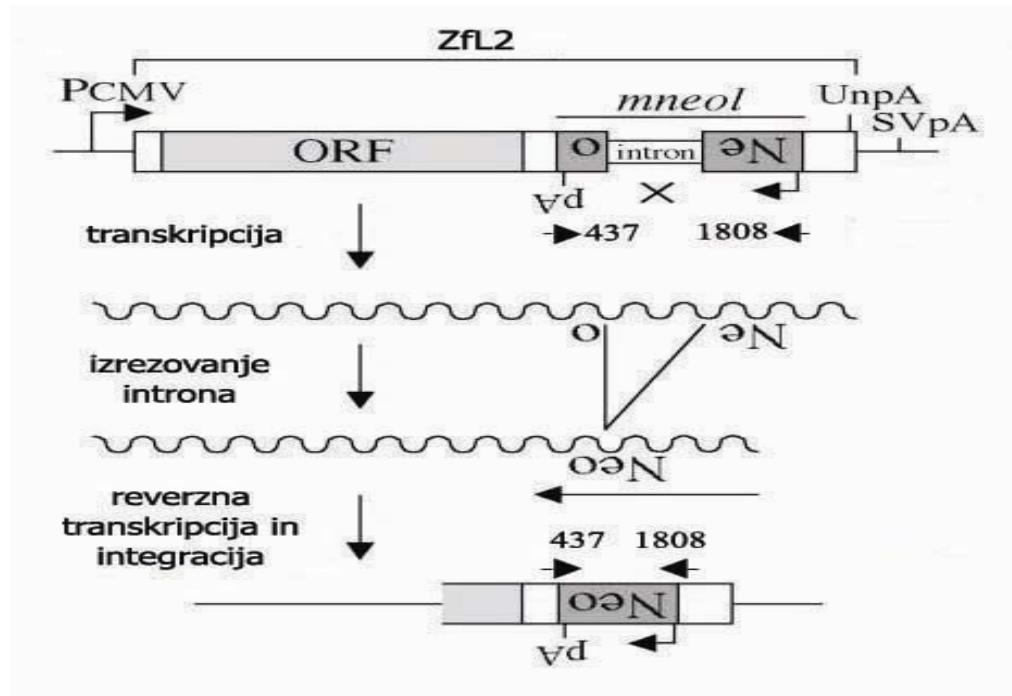
3.2.4 Določanje hitrosti retrotranspozicije

Za določanje hitrosti retrotranspozicije smo uporabili LINE-2 retrotranspozon, označen z kaseto *mneol*. Kaseto *mneol* se nahaja na 3' koncu retrotranspozona in predstavlja gen za neomicinsko rezistenco (gen *neo*) v protismiselni smeri, ki je prekinjen z intronom za človeški γ -globin v smiselni smeri. V originalni kopiji gena se neomicin ne izrazi zaradi prisotnosti introna, ki leži med promotorjem za gen *neo* in zaporedjem, ki kodira gen *neo*. Prekinjen gen *neo* je osnova za določanje hitrosti retrotranspozicije. Neomicinska rezistenca se pojavi šele po reverzni transkripciji, integraciji v genomsko DNA in ekspresiji gena *neo* (*Slika 12*). Po transkripciji vsebuje transkript retrotranspozona protismiselno kopijo gena *neo*. Po reverzni transkripciji pa se gen *neo* prepiše v smiselni smeri. Neomicinska rezistenca omogoča rezistenco tudi na antibiotike, ki so po zgradbi

podobni neomicinu (npr. geneticin). Pri selekciji celic z geneticinom bodo rezistentne le tiste celice, v katerih je retrotranspozicija potekla popolno. V primeru, ko retrotranspozicija poteče nepopolno (npr. se ustavi na stopnji intermediata), se gen *neo* ne bo izrazil (52).

Hitrost retrotranspozicije označenega ZfL2 retrotranspozona smo opazovali v prisotnosti posameznih proteinov APOBEC3. Izvedli smo kotransfekcijo pripravljenih plazmidov, ki nosijo zapis za posamezen protein APOBEC3 in plazmida BZ-25 v sesalske celice HeLa. Plazmid BZ-25 nosi zapis za ZfL2 retrotranspozon. Vpliv praznega plazmida pcDNA6 na retrotranspozicijo smo preverili s kotransfekcijo plazmidov pcDNA6 in BZ-25. Vzporedno pa smo izvedli tudi transfekcijo samo plazmida BZ-25.

Celice smo po kotransfekciji prenesli iz plošč s 6 vdolbinicami na 10-cm polistirenske plošče. Četrti dan po kotransfekciji smo začeli s selekcijo, kjer smo pripravljeno gojišče DMEM zamenjali z 10 mL gojišča DMEM, ki smo mu predhodno dodali določen volumen antibiotika geneticina (preračunan glede na določeno minimalno koncentracijo antibiotika, ki še ubije celice - 500 µg/mL). Vsak dan smo pod mikroskopom spremljali morebitno rast celic. Gojišče z antibiotikom geneticinom smo zamenjali z novim vsakih 48 ur. Selekcija je potekala 10 dni. Preživelim celicam smo odsesali gojišče in jih sprali s 1x fosfatnim puferom (DPBS). Fosfatni pufer smo odsesali in celice fiksirali z metanolom. Metanol smo nato odsesali in celice obarvali z modrim barvilom Trypan Blue (redčen 1:3, Sigma). S štetjem obarvanih celic smo določili kateri proteini APOBEC3 najbolj inhibirajo retrotranspozicijo ZfL2 retrotranspozona.



Slika 12: Shematski prikaz principa, na katerem temelji določanje hitrosti retrotranspozicije. PCMV: citomegalovirusni promotor, Neo: gen za neomicinsko rezistenco, SVpA: SV40 poliadenilacijski signal. ZfL2 retrotranspozon ima vstavljenou kaseto *mneol* (detekcijsko kaseto). Kaseto *mneol* vključuje gen za neomicinsko rezistenco (gen *neo*) v protismiseln smeri, ki je prekinjen z intronom za človeški γ -globin v smisleni smeri. Pri procesu retrotranspozicije se po transkripciji intron izreže, vendar ima transkript še vedno protismiselno informacijo za neomicinsko rezistenco. Neomicinska rezistenca se pojavi šele po reverzni transkripciji in integraciji kopije gena *neo* v genom (13).

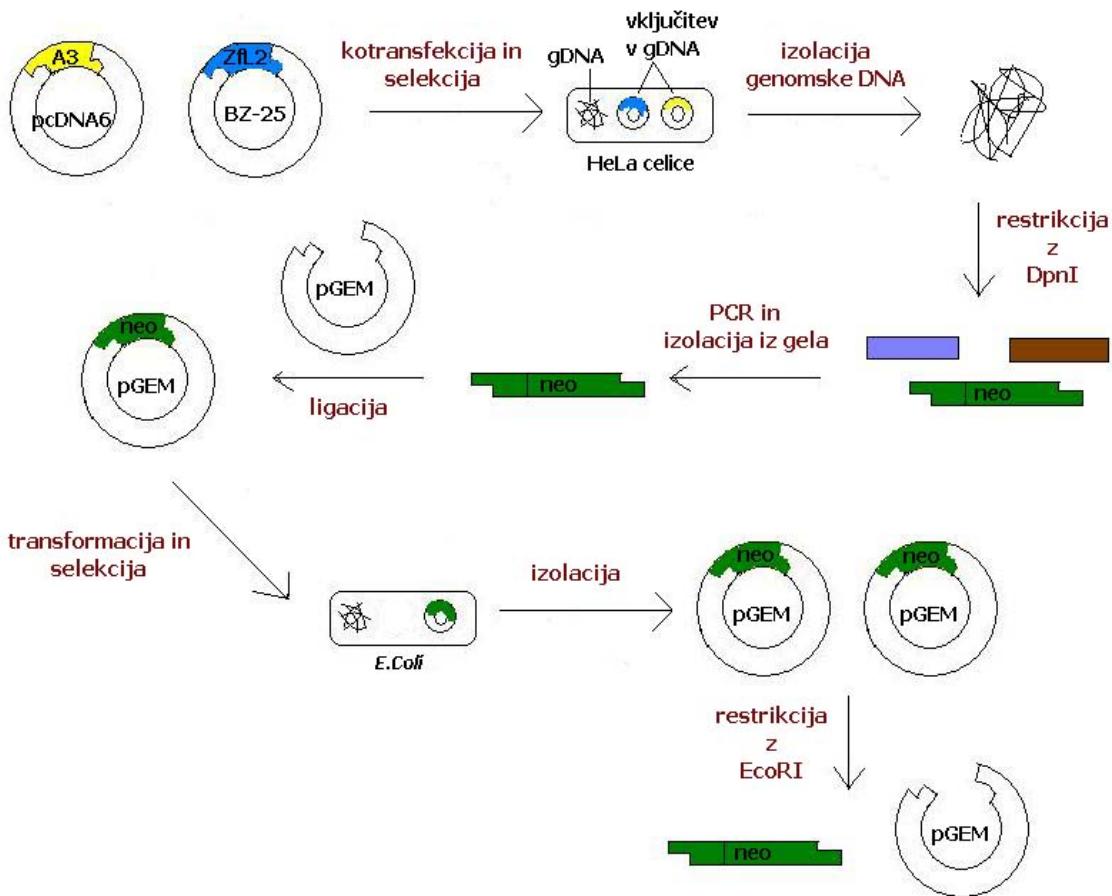
3.2.4.1 SELEKCIJA CELIC HELA Z GENETICINOM

Ker preverjanje hitrosti retrotranspozicije temelji na pojavu celičnih kolonij, rezistentnih na antibiotik, smo določili najnižjo koncentracijo antibiotika, ki še ubije celice HeLa.

Minimalno koncentracijo antibiotika, ki še ubije celice, smo določili tako, da smo celicam HeLa v ploščah s 6 vdolbinicami dodali različno količino antibiotika geneticina ($c=50$ mg/mL, Gibco). Končne koncentracije antibiotika v posamezni vdolbinici so bile: 0, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 in 1500 μ g/mL. Celicam smo zamenjali gojišče in jim ponovno dodali ustrezno koncentracijo geneticina vsake 3-4 dni. Pod mikroskopom smo dnevno opazovali odstotek preživelih celic. Celice se v prisotnosti letalne doze antibiotika delijo enkrat ali dvakrat, tako da se učinek antibiotika pokaže šele po nekaj dneh (51). Za

selekcijo celic HeLa z genetincinom smo uporabili najnižjo koncentracijo antibiotika, pri kateri so vse celice umrle (500 µg/mL).

3.2.5 Določanje mutacij G v A v kopijah retrotranspozona



Slika 13: Shematski prikaz postopka določanja mutacij G v A v kopijah retrotranspozona ZfL2.
Izvedli smo kotransfekcijo plazmida BZ-25, ki nosi retrotranspozon ZfL2 in plazmida, ki nosi zapis za določen APOBEC3 protein v sesalske celice HeLa. Za selekcijo celic, ki so sprejeli retrotranspozon, smo uporabili antibiotik higromicin. Iz preživelih celic po selekciji smo izolirali genomsko DNA (gDNA). Genomsko DNA smo razrezali z restriktazo DpnI in s PCR reakcijo pomnožili gen *neo* razrezane DNA. Gen *neo* smo nato klonirali v vektor pGEM in rekombinantni plazmid transformirali v bakterijske celice *E.Coli*. S selekcijo z modro-belim testom smo določili le tiste celice, ki so sprejeli rekombinantni plazmid. Plazmidno DNA smo izolirali iz bakterijskih celic in jo analizirali z restrikcijo z encimom EcoRI. Ustrezne rekombinantne plazmide smo sekvenirali in določili nukleotidno zaporedje vstavljenega DNA (gena *neo*).

3.2.5.1 DOLOČANJE NA NOVO INTEGRIRANIH KOPIJ RETROTRANSPOZONA V GENOMU

Izvedli smo kotransfekcijo plazmida BZ-25, ki nosi retrotranspozon ZfL2 in plazmida, ki nosi zapis za določen protein APOBEC3 v sesalske celice HeLa. Celice smo 2 dni po kotransfekciji prenesli iz plošč s 6 vdolbinicami na 10-cm plošče in jim dodali 10 mL pripravljenega gojišča DMEM. Naslednji dan smo celicam dodali ustrezен volumen antibiotika Higromicin B ($c=50$ mg/mL, Invitrogen). Plazmid BZ-25 namreč nosi rezistenco na higromicin, kar omogoča, da ločimo celice, kjer je potekla transfekcija od celic, ki ne vsebujejo plazmidne DNA. Koncentracija antibiotika v vsakem žepku je bila 200 μ g/mL. Četrti dan selekcije smo celicam odsesali gojišče in jih sprali z 1x fosfatnim puferom (DPBS). Fosfatni pufer smo odsesali in ponovno dodali 1 mL 1x DPBS. Celice smo centrifugirali 5 minut pri 3000 obratih/min. Sledila je izolacija genomske DNA iz celic v sedimentu, ki je potekala z uporabo DNeasy® Blood & Tissue Kita (QIAGEN) po navodilih proizvajalca. Majhno količino izolirane genomske DNA smo razrezali z restriktazo DpnI. Restriktijska zmes je vsebovala genomsko DNA, encim DpnI (20,000 U/mL, MBI Fermentas), 10x NEB4 pufer (MBI Fermentas) in deionizirano vodo. Restriktijska zmes je potekala 2 uri pri 37 °C.

3.2.5.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin. Z njo lahko pomnožimo tarčni odsek DNA, ki ga opredelimo z oligonukleotidnima začetnikoma. Reakcija poteka ciklično v treh stopnjah: denaturacija DNA, prileganje oligonukleotidnih začetnikov ter izgradnja komplementarne verige. Vsak cikel, ki vsebuje vse tri stopnje, se 20-40-krat ponovi (49).

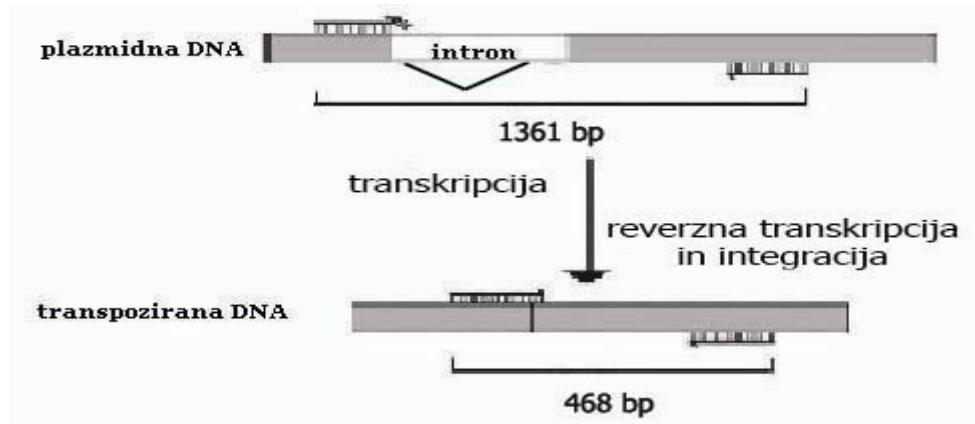
Vključitev retrotranspozona na novo mesto v genomu smo preverili s PCR. Reakcijska zmes je vsebovala izolirano genomsko DNA, dva oligonukleotidna začetnika, 2x *Taq* Master Mix (MBI Fermentas) in deionizirano vodo. Pomnožili smo gen *neo*, integriran v izolirano genomsko DNA. Kot oligonukleotidna začetnika smo uporabili 437s in 1808as (začetnika *neo*). Poleg vzorcev smo pripravili še negativno kontrolo, kjer smo DNA nadomestili z deionizirano vodo. Preverili smo tudi integriteto genomske DNA s pomnoževanjem hišnega gena, ki nosi zapis za fosfoglicerat-kinazo (PGK). Hišni gen je v

genomu prisoten v eni kopiji. Pri pomnoževanju hišnega gena smo uporabili začetnika PGF_{for} in PGK_{rev} (začetnika PGK).

Uporabili smo naslednji program za reakcijo:

<u>95 °C</u>	<u>1 min</u>	
94 °C	20 s	
55 °C	30 s	
<u>72 °C</u>	<u>1 min 30 s</u>	{ 25 ciklov
72 °C	7 min	

Produkte PCR smo analizirali z agarozno elektroforezo. Produkti, pomnoženi z začetnikoma *neo* so bili dveh velikosti: lisa velikosti 1361 bp predstavlja gen *neo* z intronom, ki se ni izrezal, lisa pri 468 bp pa predstavlja gen *neo* brez introna. Fragmente manjše velikosti smo izolirali iz gela z uporabo QIAquick Gel Extraction Kita (QIAGEN) po navodilih proizvajalca.



Slika 14: Struktura gena *neo* pred in po retrotranspoziciji. S PCR in uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov (437s in 1808as) pri reakciji smo gen *neo* pomnožili. Označene so velikosti fragmentov po PCR, kot jih vidimo na gelu (47).

3.2.5.3 KLONIRANJE GENA NEO

a.) Ligacija v vektor pGEM®-T Easy

Vektor pGEM®-T Easy se običajno uporablja za kloniranje PCR produktov. Vektor je že v obliki, primerni za ligacijo, saj je razrezan z encimom EcoRV. Izpad inserta po ligaciji omogoča uporabo le ene restriktaze preko restriktivnih mest EcoRI, NotI ali BstZI (53).

Izolirane PCR produkte smo ligirali v vektor pGEM®-T Easy (Promega). Ligacijska zmes je vsebovala PCR produkt, vektor pGEM®-T Easy, T4 ligazo (400,000 U/mL, New England BioLabs) in 2x ligazni pufer (New England BioLabs). Ligacija je potekala 20 ur pri 16 °C.

b) Selekcija z modro-belim testom

Uporaba modro-belega testa omogoča, da ločimo med bakterijskimi kolonijami, ki so sprejele rekombinatni plazmid, in tistimi, ki rekombinantnega plazmida niso sprejele. Selekcijo omogoča prisotnost reagenta X-gal na trdnem LBA gojišču.

Seleksijsko gojišče LBA/X-gal smo pripravili tako, da smo na segreto trdno LBA gojišče nanesli reagent X-gal. X-gal je netoksična raztopina in deluje kot substrat za β -galaktozidazo. β -galaktozidaza hidrolizira X-gal v 4-kloro-3-brom indigo in brezbarvno glukozo. 4-kloro-3-brom indigo tvori intenzivno modro obarvano oborino. Prisotnost *lacZ* gena vodi do hidrolize X-gala in s tem do razvoja modre barve. V rekombinantnih plazmidih je *lacZ* nadomeščen z insertom, v nerekombinantnih pa ne. Bakterijske kolonije bele barve imajo plazmid, ki je sprejel insert (ligacija je bila uspešna), modre kolonije pa plazmid brez inserta (posledica neuspešne ligacije) (54).

Ligacijsko zmes smo transformirali v Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ *E.Coli* bakterijske celice. Izvedli smo selekcijo bakterijskih kolonij z modro-belim testom. Transformacijsko zmes smo nanesli na predhodno pripravljeno seleksijsko gojišče LBA/X-gal. Gojišča s celicami smo čez noč inkubirali na 37 °C. Iz vsake plošče smo vzeli nekaj belih kolonij in jih nacepili v tekoče LBA gojišče, inkubirali čez noč na 37 °C in izolirali plazmidno DNA iz celic z postopkom minipreparacije. Uporabili smo QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) in izolacijo izvedli po navodilih proizvajalca.

c) Restrikcija z EcoRI

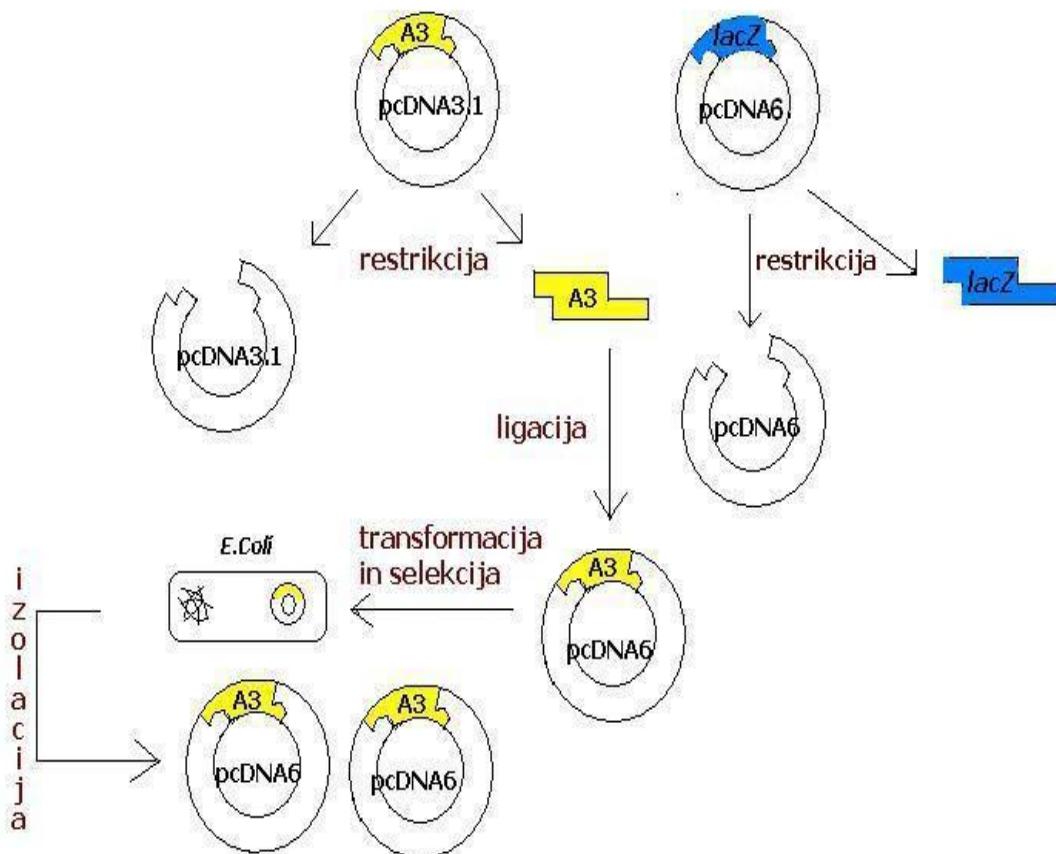
Vključitev PCR fragmenta v plazmid smo preverili z restriktivno analizo. Restriktivna zmes je vsebovala plazmidno DNA, encim EcoRI (20,000 U/mL, MBI Fermentas), 10x NEB2 bufer (MBI Fermentas) in deionizirano vodo. Restrikcija je potekala 2 uri pri 37 °C. Plazmidom, ki so vsebovali želen insert (gen *neo*) smo določili nukleotidno zaporedje.

**3.2.5.4 DOLOČANJE MUTACIJ IZ GVANINA V ADENIN S PRIMERJAVO
NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ DVEH GENOV**

Pri iskanju mutacij G v A v kopijah gena *neo* retrotranspozona, smo nukleotidno zaporedje originalnega gena *neo* (pred retrotranspozicijo) primerjali z zaporedjem kopije gena *neo* (po retrotranspoziciji). Najprej smo nukleotidna zaporedja poravnali s programom ClustalW2. Pri poravnavi gre za razvrstitev zaporedij DNA molekul z namenom identifikacije enakih oziroma podobnih regij v obih molekulah. Podobne regije so lahko vzrok za strukturno, funkcionalno ali evolucijsko razmerje med obema DNA molekulama. Nato smo s programom GENEDOC pretvorili nukleotidna zaporedja v pravo obliko za obdelavo s programom za iskanje mutacij, Hypermut 2.0. V zadnji stopnji smo s programom Hypermut 2.0 pripravljeni zaporedji primerjali med seboj. Hypermut 2.0 omogoča določanje mutacij G v A, saj ima že nastavljen program za iskanje teh vrst mutacij, ki jih povzročijo proteini APOBEC3. Tako smo dobili informacije o morebitnih mutacijah v analiziranih zaporedjih.

4 REZULTATI

4.1 SUBKLONIRANJE

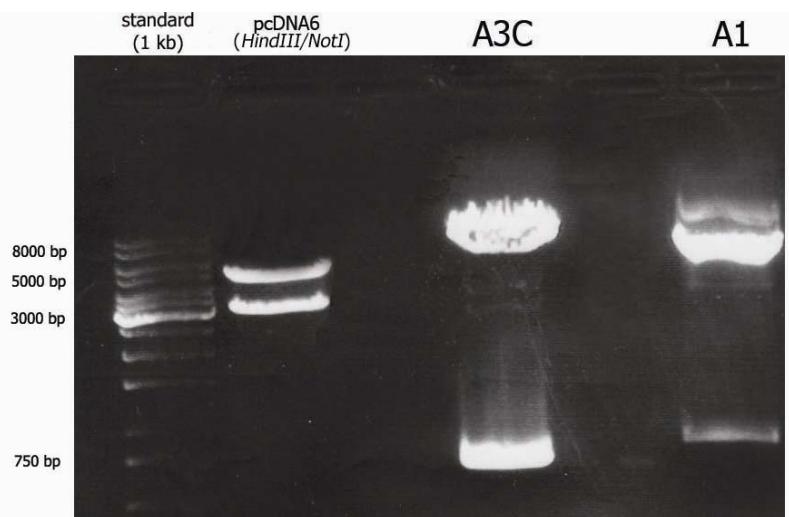


Slika 15: Shema subkloniranja proteinov APOBEC3. Zapis za proteine APOBEC3 smo iz vektorja pcDNA3.1 subklonirali v vektor pcDNA6. Nov rekombinantni plazmid smo namnožili v bakterijskih celicah *E.coli*. Selekcija z ampicilinom je ločila tiste celice, ki so sprejele plazmid. Sledila je izolacija rekombinantnega plazmida iz bakterijskih celic. Plazmide smo analizirali z restrikcijo. Ustreznim vzorcem smo nazadnje določili nukleotidno zaporedje.

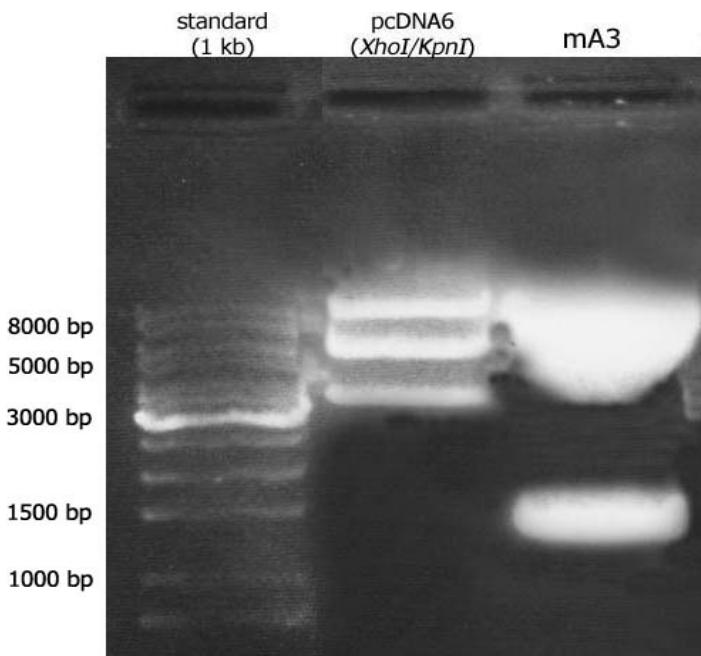
Plazmid pcDNA3.1, ki je vseboval zapis za določen protein APOBEC3 smo razrezali z dvema restriktazama. Z enakima encimoma smo razrezali tudi plazmid pcDNA6-*lacZ*.



Slika 16: Restrikcija plazmida pcDNA6-*lacZ* z encimoma HindIII in XbaI, plazmida pcDNA3.1-A3G z encimoma XbaI in KpnI ter plazmida pcDNA3.1-A3F z encimoma HindIII in NotI. Najvišja lisa pri pcDNA6-*lacZ* predstavlja nerazrezen plazmid, lisa v sredini razrezen plazmid pcDNA6, najnižja pa *lacZ*. Zgornje lise pri plazmidih pcDNA3.1-APOBEC3 predstavljajo razrezen plazmid pcDNA3.1, spodnje lise pa zapis za posamezen protein APOBEC3 (insert).

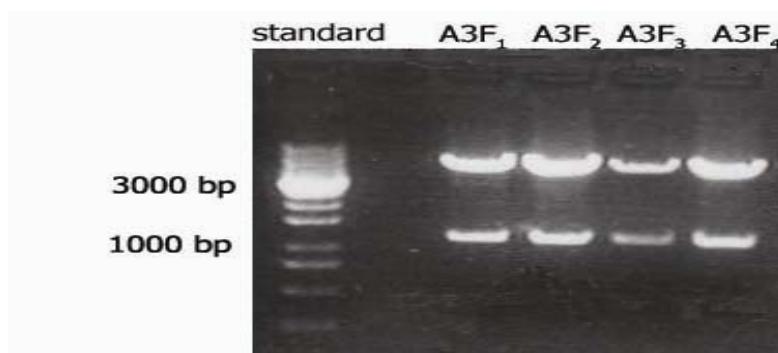


Slika 17: Restrikcija plazmidov pcDNA6-*lacZ*, pcDNA3.1-A3C in pcDNA3.1-A1 z encimoma HindIII in NotI. Zgornja lisa pri plazmidu pcDNA6-*lacZ* ustreza razrezenemu plazmidu pcDNA6, spodnja pa predstavlja *lacZ*. Zgornji lisi pri plazmidih pcDNA3.1-APOBEC3 predstavljata razrezen plazmid pcDNA3.1, spodnji lisi pa zapis za posamezen protein APOBEC3 (insert).



Slika 18: Restrikcija plazmidov pcDNA6-*lacZ* in pcDNA3.1-mA3 z encimoma *Xba*I in *Kpn*I. Najvišja lisa pri pcDNA6-*lacZ* predstavlja nerazrezan plazmid, lisa v sredini razrezan plazmid pcDNA6, najnižja pa *lacZ*. Zgornja lisa pri pcDNA3.1-mA3 predstavlja razrezan plazmid pcDNA3.1, spodnja lisa pa zapis za protein mA3 (insert).

Insert (zapis za posamezen protein APOBEC3) smo v nadaljevanju ligirali z razrezanim plazmidom pcDNA6. Po ligaciji inserta in plazmida pcDNA6 smo ligacijsko zmes transformirali v bakterijske celice *E.Coli*. Rekombinantne plazmide smo po transformaciji analizirali z restrikcijo.



Slika 19: Primer restrikcije plazmida pcDNA6-A3F z encimoma *Hind*III in *Not*I. Iz 4 kolonij bakterijskih celic smo izolirali plazmidno DNA in jo v nadaljevanju razrezali z encimoma *Hind*III in *Not*I. Vsi analizirani bakterijski kloni so bili pozitivni, saj je izoliran plazmid vseboval insert. Zgornja lisa pri plazmidih predstavlja razrezan plazmid pcDNA6, spodnja lisa pa zapis za protein A3F (insert).

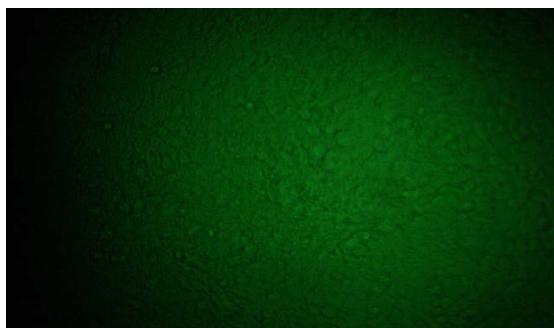
4.2 POTRDITEV EKSPRESIJE PROTEINOV

Ekspresijo proteinov APOBEC3 v sesalskih celicah smo potrdili s postopkom prenosa western. Plazmide pcDNA6, ki nosijo zapis za proteine APOBEC3, smo transficirali v sesalske celice 293T.

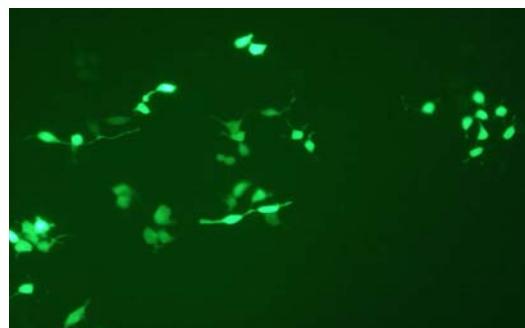
4.2.1 Določanje učinkovitosti transfekcije

Učinkovitost transfekcije plazmidov pcDNA6-APOBEC3 smo določili s transfekcijo plazmida, ki nosi zapis za zeleni fluorescenčni protein (GFP) v celice 293T. Pod fluorescenčnim mikroskopom smo pogledali prisotnost proteina GFP v celicah 293T. Celice, v katerih je prišlo do ekspresije GFP, so se pod mikroskopom obarvale zeleno. Število obarvanih celic smo primerjali z številom vseh celic v vidnem polju. Ocenili smo, da je približno 90% celic sprejelo plazmid (*Slika 20, A*). Predpostavili smo, da je učinkovitost transfekcije rekobinantnih plazmidov pcDNA6-APOBEC3 enaka učinkovitosti transfekcije plazmida, ki nosi GFP. Intenzivno zeleno obarvane celice so bile žive, manj intenzivno obarvane celice pa so bile mrtve (*Slika 20, B*).

A)



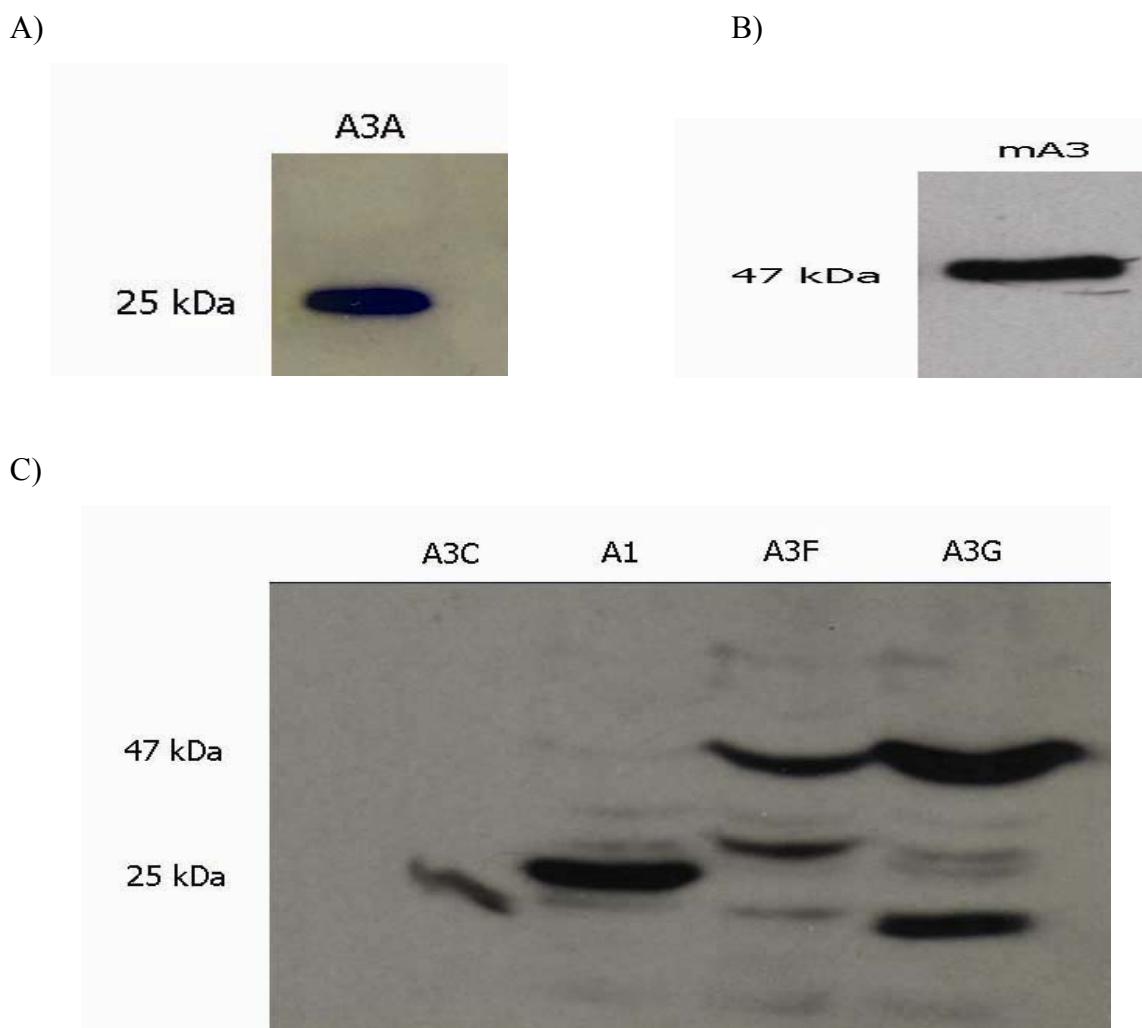
B)



Slika 20: Zeleno obarvane celice, v katerih je prišlo do ekspresije zelenega fluorescenčnega proteina (GFP). A) Vse celice v vidnem polju, ki so bile transficirane s plazmidom, ki nosi zapis za GFP. Približno 90% vseh celic je zeleno obarvanih, kar pomeni da je bila učinkovitost transfekcije približno 90% **B)** Celice, ki vsebujejo GFP smo pod fluorescenčnim mikroskopom opazovali pri 10x povečavi. Intenzivno obarvane celice so žive, mrtve celice pa so manj intenzivno obravane.

4.2.2 Prikaz ekspresije proteinov

Zapis za posamezen protein APOBEC3 smo vnesli v sesalske celice 293T ter s postopkom prenosa western potrdili ekspresijo proteinov. Za detekcijo proteinov z *myc*-repom (proteini A3C, A3F, A3G, A1 in mA3) smo uporabili primarna mišja monoklonska protitelesa proti *myc*-repu (anti-*myc* protitelesa). Protein s *HA*-repom (protein A3A) pa smo detektirali s primarnimi mišjimi monoklonskimi protitelesi proti *HA*-repu (anti-*HA* protitelesa). Protitelesa prepoznajo *myc*-rep ali *HA*-rep proteina kot antigen in se nanj specifično vežejo. Velikost lis na filmu ustreza proteinom APOBEC3. A3A, A3C in A1 imajo velikost približno 25 kDa, A3F, A3G in mA3 pa okoli 47 kDa (49).



Slika 21: Prikaz ekspresije proteinov APOBEC3 v sesalskih celicah 293T. A) Protein A3A smo detektirali z anti-*HA* protitelesi, B) protein mA3 pa smo detektirali z anti-*myc* protitelesi. C) Prav tako smo z anti-*myc* protitelesi detektirali proteine A3C, A3F, A3G in A1.

4.3 DOLOČANJE HITROSTI RETROTRANSPOZICIJE

Pri določanju hitrosti retrotranspozicije v prisotnosti proteina APOBEC3 smo uporabili retrotranspozon, ki je označen z genom za neomicinsko rezistenco (genom *neo*). Gen *neo* omogoča rezistenco na antibiotike, ki so po strukturi podobni neomicinu. Rezistenca na antibiotik se izrazi le, če pri retrotranspoziciji pride do reverzne transkripcije, integracije kopije retrotranspozona v genom ter ekspresije gena *neo*. Za selekcijo celic, v katerih je prišlo do ekspresije gena *neo*, smo uporabili antibiotik geneticin.

Zapis za protein APOBEC3 in ZfL2 retrotranspozon smo transficirali v celice HeLa. Netransficirane celice HeLa v prisotnosti antibiotika niso preživele. Nasprotno so celice, transficirane le s plazmidom, ki je nosil retrotranspozon, preživele, saj je lahko retrotranspozicija nemoteno potekla. Celice, ki so bile kotransficirane s plazmidom, ki je nosil retrotranspozon in plazmidom pcDNA6, so prav tako preživele, saj pcDNA6 ni vseboval zapisa za protein APOBEC3, ki bi lahko inhibiral retrotranspozicijo (*Slika 22, A*). Večje število preživelih celic po selekciji z geneticinom je pomenilo, da določen protein APOBEC3 manj inhibira ali pa sploh ne inhibira retrotranspozicije. Manjše število preživelih celic oziroma njihova odsotnost po selekciji pa je pomenila, da določen protein APOBEC3 inhibira retrotranspozicijo, saj se gen za neomicinsko rezistenco ni izrazil. V prisotnosti proteinov A3F, A3G in A1 je bilo število preživelih celicah najmanjše. V primerih ekspresije proteinov A3A, A3C in mA3 pa je bilo število preživelih celic največje (*Slika 22, B*).

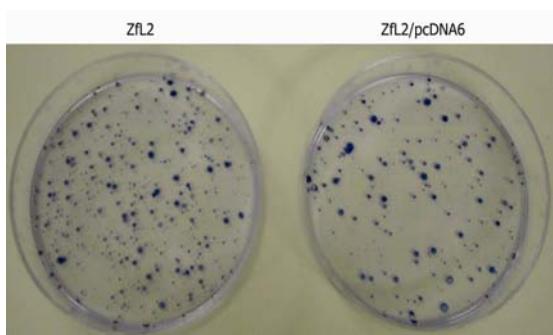
Na podlagi števila preživelih celic po selekciji z geneticinom smo izračunali odstotek retrotranspozicije po enačbi:

$$\% \text{ retrotranspozicije} = n / N; \text{ kjer je}$$

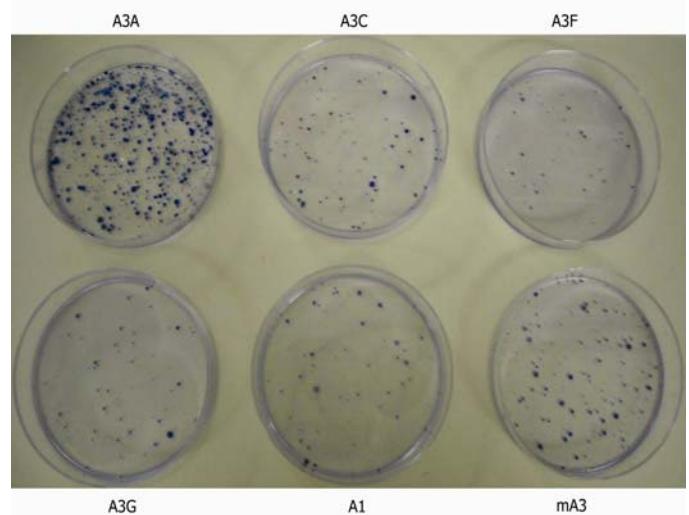
- n: število preživelih celic v prisotnosti proteina APOBEC3 in ZfL2 retrotranspozona
- N: število preživelih celic v prisotnosti plazmida pcDNA6 in ZfL2 retrotranspozona

Retrotranspozicijo ZfL2 retrotranspozona v največji meri inhibirajo proteini A3F, A3G in A1, v najmanjši meri pa proteina A3C in mA3. Protein A3A nima inhibitornega učinka, ampak retrotranspozicijo celo nekoliko pospeši (*Slika 22, C*).

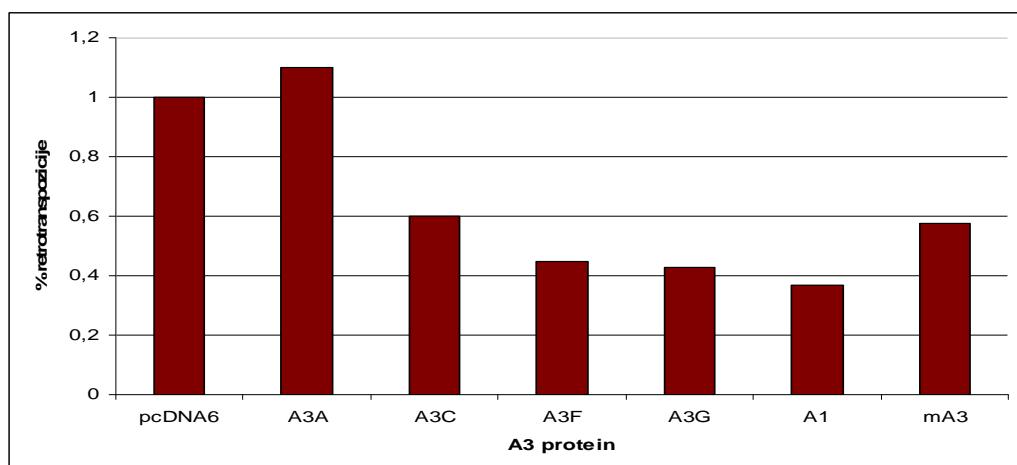
A)



B)



C)



Slika 22: Določanje hitrosti retrotranspozicije ZfL2 retrotranspozona v prisotnosti različnih proteinov APOBEC3. **A)** Preživele kolonije celic, transficiranih z plazmidom BZ-25, ki nosi ZfL2 retrotranspozon (levo) oziroma kotransficiranih s plazmidoma BZ-25 in pcDNA6 (desno), po selekciji z geneticinom. V obeh primerih je bilo število preživelih celic približno enako. **B)** Preživele kolonije celic, kotransficiranih s plazmidom BZ-25 ter plazmidom pcDNA6, ki nosi zapis za določen protein APOBEC3. Največ preživelih celic je bilo v prisotnosti proteinov A3A, A3C in mA3. Najmanj preživelih celic po selekciji pa je bilo v prisotnosti proteinov A3F, A3G in A1. **C)** Prikaz inhibitornega učinka proteinov APOBEC3 na retrotranspozicijo ZfL2 retrotranspozona. V primeru kotransfekcije plazmidov BZ-25 in pcDNA6 je retrotranspozicija potekla popolnoma (ni bilo inhibicije). V primeru ekspresije posameznih proteinov APOBEC3 pa je prišlo do delne inhibicije, pri čemer proteini A3F, A3G in A1 inhibirajo retrotranspozicijo v največji meri, proteina A3C in mA3 pa v najmanjši meri. Protein A3A retrotranspozicije ne inhibira, temveč jo celo nekoliko pospeši.

4.4 DOLOČANJE MUTACIJ V KOPIJAH ZFL2 RETROTRANSPOZONA

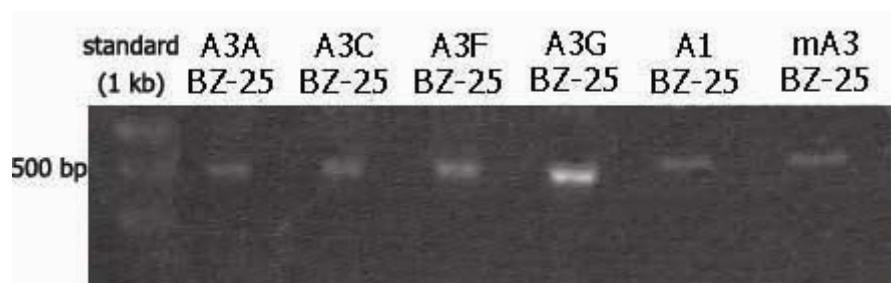
Proteini APOBEC3 inhibirajo retrotranspozicijo LTR-retrotranspozonov preko deaminacije citozina v uracil na negativni verigi cDNA, kar vodi v akumulacijo mutacij G v A na pozitivni verigi cDNA (44).

Izvedli smo kotransfekcijo plazmida BZ-25, ki nosi ZfL2 retrotranspozon in posameznih plazmidov pcDNA6-APOBEC3. Selekacija s higromicinom je omogočila preživetje celic HeLa, ki so sprejele ZfL2 retrotranspozon. Z izolacijo genomske DNA iz sesalskih celic ter nadaljnjo uporabo bioinformatike smo preverili, ali proteini APOBEC3 povzročijo mutacije G v A v kopiji retrotranspozona, natančneje v genu *neo*.

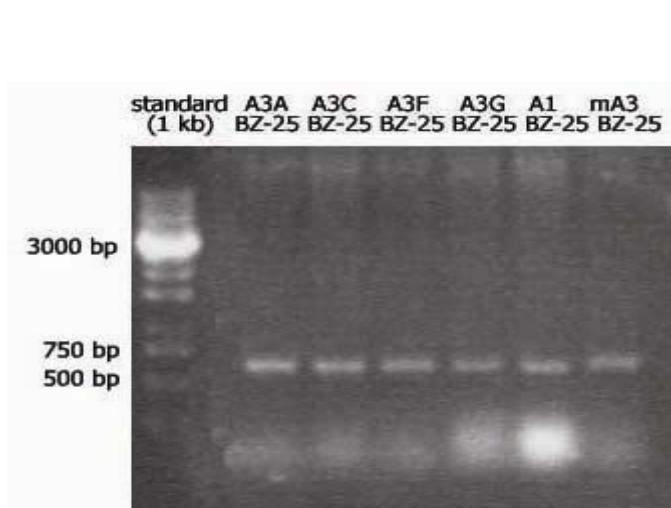
4.4.1 PCR reakcija

Po selekciji z higromicinom smo iz preživelih celic HeLa izolirali genomsko DNA. Prisotnost retrotranspozona v celici ne pomeni vedno, da je retrotranspozicija potekla ali, da je prišlo do integracije v genom. S PCR smo nato pomnožili gen *neo* izolirane genomske DNA, saj smo iskali mutacije le v tem delu retrotranspozona. Gen *neo* smo pomnožili z oligonukleotidnima začetnikoma 437s in 1808as (začetnika *neo*). PCR fragmente smo analizirali z agarozno elektroforezo. Fragmenti velikosti 468 bp predstavljajo gen *neo* brez introna (*Slika 23, A*). Pomnožen gen *neo* brez introna smo izolirali iz gela. S pomnoževanjem hišnega gena, ki nosi zapis za fosfoglicerat-kinazo (PGK) smo preverili morebitne poškodbe genomske DNA ter enakost njene koncentracije pri vseh vzorcih. Izolirano genomsko DNA smo pomnožili z oligonukleotidnima začetnikoma PGF_{for} in PGK_{rev} (začetnika PGK). Analiza PCR fragmentov z agarozno elektroforezo je potrdila ustreznost vzorcev (*Slika 23, B*). Izvedli smo tudi negativno kontrolo reakcije, kjer smo genomsko DNA nadomestili z deionizirano vodo. Analiza PCR fragmentov z elektroforezo je pokazala, da genomska DNA ni bila kontaminirana, saj na gelu ni bilo prisotnih lis (*Slika 23, C*).

A)



B)



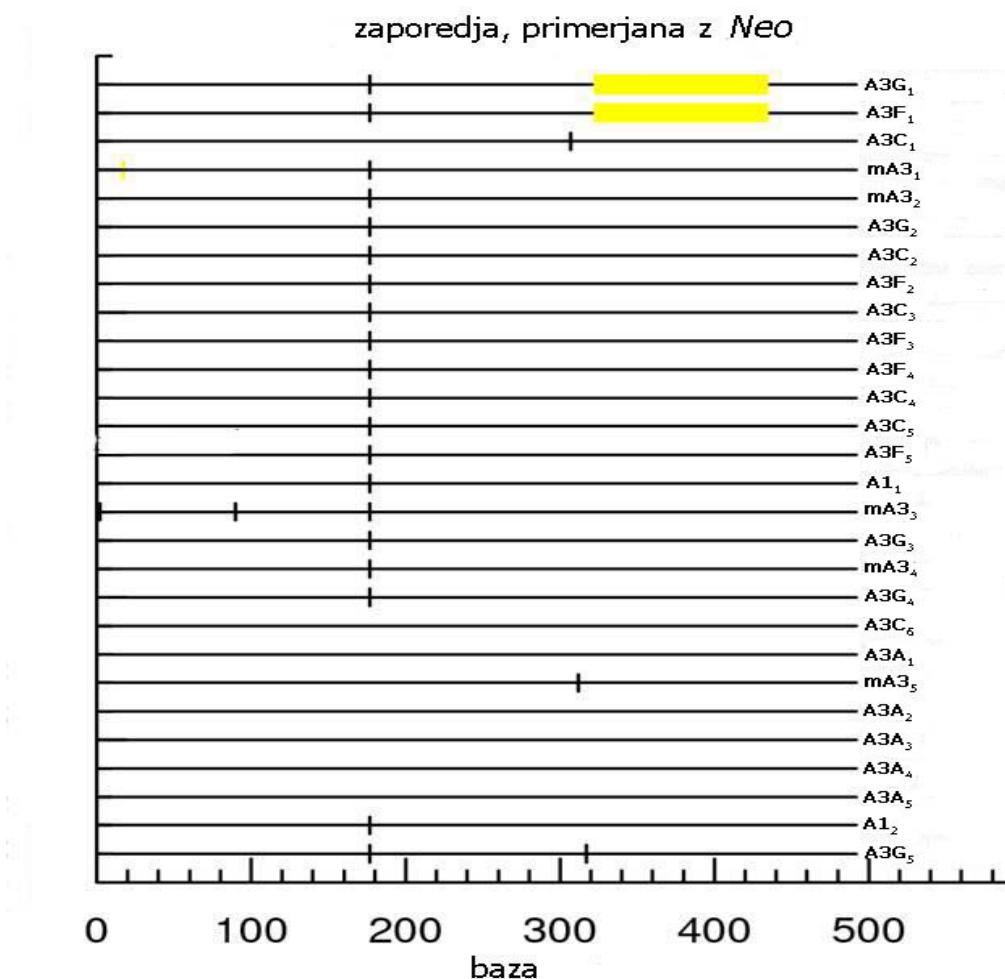
C)



Slika 23: PCR produkti, pomnoženi z oligonukleotidnima začetnikoma PGK_{for} in PGK_{rev} (PGK začetnika) ter oligonukleotidnima začetnikoma 437s in 1808as (začetnika neo). **A)** Fragmenti velikosti 468 bp predstavljajo gen, ki nosi zapis za neomicinsko rezistenco (gen *neo*). Ti fragmenti ne vsebujejo introna, saj se je med retrotranspozicijo izrezal. Tako smo določili le tiste fragmente, kjer je retrotranspozicija potekla popolno. **B)** Produkti PCR reakcije, pomnoženi z začetnikoma PGK, ki nakazujejo ustreznou integrireto izolirane genomske DNA. **C)** Negativni kontroli PCR reakcije, kjer smo genomsko DNA nadomestili z deionizirano vodo in jo v prvem primeru pomnožili z začetniki *neo* in v drugem primeru z začetniki PGK. Odsotnost lis na gelu potrjuje nekontaminiranost genomske DNA.

4.4.2 Določanje mutacij G v A v kopijah retrotranspozona

Po retrotranspoziciji ZfL2 retrotranspozona smo v na novo integriranih kopijah retrotranspozona določali mutacije G v A. Mutacije smo iskali le v genu *neo*. Primerjali smo nukleotidno zaporedje gena *neo* pred retrotranspozicijo in zaporedje kopije gena *neo*, integriranega v genom po retrotranspoziciji. Za iskanje mutacij smo uporabili program Hypermut 2.0 (*Slika 24*).



Slika 24: Prikaz mutacij G v A v kopijah gena *neo* ZfL2 retrotranspozona. Navpične črte prikazujejo mutacije, kjer ne gre za spremembo G v A, rumena barva pa prikazuje vrzeli. V nobenem vzorcu kopije gena *neo* ni bilo prisotnih mutacij G v A, kar pomeni, da proteini APOBEC3 ne povzročajo tovrstnih mutacij v tem delu retrotranspozona.

5 RAZPRAVA

LINE-2 retrotranspozoni, ki predstavljajo le približno 3% človeškega genoma, spadajo v skupino non-LTR retrotranspozonov. Njihov način retrotranspozicije »kopiraj in prilepi« vodi do različnih mutacij, kar pogosto pripelje do razvoja genetskih bolezni (1, 12, 20-22). Znano je, da proteini APOBEC3, ki so naravno prisotni v človeškem organizmu, preprečujejo retrotranspozicijo LTR retrotranspozonov (npr. IAP retrotranspozona) in tudi non-LTR retrotransponov (npr. LINE-1 retrotranspozonov). Retrotranspozicijo LTR-retrotranspozonov preprečujejo po mehanizmu deaminacije citozina v uracil na negativni verigi cDNA kopije retrotranspozona, kar vodi do pojava številnih mutacij G v A na pozitivni verigi cDNA (31, 44-46). V pričujočem delu smo pripravili ekspresijske vektorje, ki nosijo zapis za proteine APOBEC3 in preverili njihovo izražanje v sesalskih celičnih kulturah ter primerjali hitrost retrotranspozicije LINE-2 retrotranspozona v prisotnosti različnih proteinov APOBEC3. Preverili smo tudi ali proteini APOBEC3 preprečijo retrotranspozicijo LINE-2 retrotranspozonov po mehanizmu deaminacije.

5.1 POTRDITEV EKSPRESIJE PROTEINOV S PRENOSOM WESTERN

Proteini APOBEC3 vplivajo na retrotranspozicijo LINE-1 retrotranspozonov z blokiranjem reverzne transkripcije in integracije kopij retrotranspozonov v genom (16). Z namenom preveriti ali hipoteza velja tudi za LINE-2 retrotranspozone, smo na začetku preverili, ali pride do ekspresije proteinov APOBEC3, za katere vnesemo zapis v sesalske celice. Uspešna ekspresija proteinov APOBEC3 v celicah je pogoj, da se lahko izrazi njihov učinek na retrotranspozicijo. V celicah 293T je prišlo do ekspresije proteinov APOBEC3. S pomočjo proteina GFP smo določili, da je učinkovitost transfekcije 90%. Kljub enaki učinkovitosti transfekcije pri vseh vzorcih, so lise na filmu pri nekaterih proteinih bolj izražene kot pri drugih. Razlog je verjetno v genu za določen protein, ki vpliva na samo ekspresijo proteina. Možen razlog pa je tudi različno število transficiranih celic pri vzorcih, ki jih uporabimo v eksperimentu. Količino proteinov (število celic, uporabljenih v eksperimentu) pri vseh vzorcih bi lahko preverili na dva načina. Pri prvem bi pred nanosom lizata na gel za NaDS-PAGE izmerili koncentracijo proteina v vseh vzorcih z

Bradfordovo oziroma Bio-radovo metodo. Pri drugem načinu pa bi membrano, ki smo jo uporabili pri postopku prenosa western, izpostavili primarnim protitelesom proti proteinu, za katerega vemo, da se izraža v vseh celicah (npr. aktin, gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza...). V tem primeru bi morale biti izražene lise na filmu enake pri vseh vzorcih. Glede na velikost in intenzivnost izraženih lis na filmu, lahko sklepamo, da je bila ekspresija največja pri proteinih A3A, A3G, in A1, najmanjša pa pri proteinu mA3. Postopek eksperimenta smo nadaljevali le s tistimi vzorci, ki so dali izrazit signal na filmu.

5.2 DOLOČANJE HITROSTI RETROTRANSPOZICIJE V PRISOTNOSTI PROTEINOV APOBEC3

Znano je, da proteini APOBEC3 inhibirajo retrotranspozicijo LINE-1 retrotranspozonov. Velikost inhibitornega učinka je pri različnih predstavnikih proteinov APOBEC3 različna. Retrotranspozicijo pri LINE-1 v največji meri inhibirajo proteini A3A, A3B in A3F, najmanj pa pri protein A3G (49). Želeli smo preveriti ali imajo proteini APOBEC3 enak učinek pri LINE-2 retrotranspozoni. Učinek proteinov smo preverjali s modelnim retrotranspozonom ZfL2, ki je bil označen z genom za neomicinsko rezistenco. Rezistanca se v celici pojavi le, če je prišlo do integracije kopije retrotranspozona v genom ter do njegove ekspresije preko promotorja. S selekcijo z genetincinom smo ločili celice, v katerih je retrotranspozicija potekla popolno. Za transfekcijo v celice HeLa smo uporabili rekombinantne plazmide pcDNA6-APOBEC3. Rekombinantnih plazmidov pcDNA3.1-APOBEC3 nismo uporabili, saj plazmid pcDNA3.1 vsebuje gen za rezistenco na neomicin. V primeru transfekcije plazmida pcDNA3.1-APOBEC3 bi pri selekciji zrasle tudi celice, kjer retrotranspozicija ni potekla popolno ter celice, ki retrotranspozona ne bi sprejele. Največji vpliv na retrotranspozicijo ZfL2 retrotranspozona imajo proteini A3F, A3G in A1, najmanjši vpliv pa imata proteina A3C in mA3. Rezultati eksperimenta z ZfL2, ki spada v skupino LINE-2 retrotranspozonov, ne potrjujejo hipoteze o delnem inhibitornem učinku proteinov APOBEC3 v celoti. Glede na rezultate protein A3A nima inhibitornega učinka oziroma retrotranspozicijo celo pospeši. Rezultati niso skladni s tistimi, pridobljenimi v eksperimentu z LINE-1 retrotranspozoni. Posamezen protein APOBEC3 ne vpliva z enako močnim inhibitornim učinkov na obe skupini LINE retrotranspozonov. Študije inhibitornega učinka proteinov APOBEC3 na LINE-1 retrotranspozicijo se med seboj zelo

razlikujejo (29). Na rezultat eksperimenta namreč vplivajo različni dejavniki, kot so vrsta sesalskih celic, v katerih izvajamo eksperiment, starost celic (število precepitev celic), vrsta gojišča, uporaba/neuporaba antibiotikov, ki jih dodamo gojišču in vrsta fetusnega seruma goveda (FBS). Omenjeni dejavniki bi lahko vplivali tudi na rezultate eksperimenta z ZfL2 retrotranspozonom. Potrebno bi bilo izvesti veliko število ponovitev eksperimenta, da bi dobili bolj točen rezultat inhibitornega učinka proteinov APOBEC3 na retrotranspozicijo ZfL2 retrotranspozona.

5.3 DOLOČANJE MUTACIJ IZ GVANINA V ADENIN V KOPIJAH RETROTRANSPOZONA

Proteini APOBEC3 spadajo v skupino encimov, imenovanih citidinske deaminaze. Študije LTR-retrotranspozonov nakazujejo, da proteini APOBEC3 inhibirajo retrotranspozicijo preko deaminacije citozina v uracil. Do deaminacije naj bi prišlo med reverzno transkripcijo retrotranspozicije (44). Želeli smo preveriti ali proteini APOBEC3 inhibirajo retrotranspozicijo ZfL2 retrotranspozona po enakem mehanizmu kot pri LTR-retrotranspozoni. Deaminacija citozina v uracil na negativni verigi cDNA kopije retroranspozona vodi v pojav številnih mutacij G v A na pozitivni verigi cDNA. V eksperimentu smo mutacije iskali v kopiji dela retrotranspozona, ki nosi gen za neomicinsko rezistenco (gen *neo*). Po izolaciji genomske DNA iz sesalskih celic, smo s PCR reakcijo pomnožili gen *neo*. Integriteto izolirane genomske DNA smo preverili s pomnoževanjem hišnega gena z začetniki PGK. PCR fragmente smo analizirali z agarozno elektroforezo. Enaki fragmenti pri vseh vzorcih, pomnoženih z začetniki PGK, pomenijo enako koncentracijo genomske DNA pri vseh vzorcih ter da pri izolaciji ni prišlo do njenih poškodb. Mutacije G v A smo iskali s programom Hypermut 2.0, ki je nukleotidno zaporedje kopije gena *neo* primerjal z zaporedjem gena *neo* pred retrotranspozicijo. V nobeni kopiji gena *neo* po retrotranspoziciji ZfL2 retrotranspozona ni bilo prisotnih mutacij iz gvanina v adenin. Odsotnost mutacij G v A v kopiji gena *neo* ne pomeni vedno, da v celotnem zaporedju ZfL2 retrotranspozona ni tovrstnih mutacij. Hipoteza o odsotnosti mutacij se je izkazala za pravilno, saj v prisotnosti kateregakoli proteina APOBEC3 nismo našli predpostavljenih mutacij. Glede na rezultate lahko sklepamo, da proteini APOBEC3 ne inhibirajo retrotranspozicije ZfL2 retrotranspozona po mehanizmu deaminacije citozina

v uracil. Proteini APOBEC3 delujejo po nekem drugem mehanizmu, ki ni odvisen od njihove deaminazne aktivnosti. To bi lahko dokončno potrdili z dodatnimi eksperimenti, kjer bi uporabili katalitično neaktivne proteine APOBEC3 (mutante). Ne smemo pa popolnoma izključiti dejstva, da proteini APOBEC3 ne inhibirajo retrotranspozicije po mehanizmu deaminacije. Med retrotranspozicijo namreč lahko pride do degradacije cDNA kopije retrotranspozona s celičnimi encimi (npr. uracil DNA-glikozilazo) in se je zato ne bi dalo detektirati. Z nadaljnimi raziskavami bi lahko določili točen mehanizem, po katerem proteini APOBEC3 inhibirajo retrotranspozicijo. Lahko bi določili, kateri celični proteini sodelujejo pri procesu retrotranspozicije ter ali so ti morebitna tarča delovanja proteinov APOBEC3.

6 SKLEPI

Na podlagi rezultatov eksperimenta lahko zaključimo naslednje:

- ekspresija posameznih proteinov APOBEC3 ni enaka, kjub uporabi enakih količin plazmidov, ki nosijo zapis za določen protein
- vsi preizkušeni proteini APOBEC3, razen A3A, delujejo inhibitorno na proces retrotranspozicije ZfL2 retrotranspozona
- vsi proteini APOBEC3 nimajo enakega inhibitornega učinka na retrotranspozicijo ZfL2 retrotranspozona. Najmočnejši inhibitorji procesa so proteini A3F, A3G in podganji APOBEC1 (A1), medtem ko proteini A3A, A3C in mišji A3 (mA3) najmanj inhibirajo retrotranspozicijo
- proteini APOBEC3 z inhibicijo procesa retrotranspozije ne povzročijo mutacij G v A v kopiji gena *neo* ZfL2 retrotranspozona. To pomeni, da proteini APOBEC3 ne delujejo inhibitorno na retrotranspozicijo ZfL2 retrotranspozona preko reakcije deaminacije, temveč po nekem drugem, še neznanem mehanizmu.

V nadaljnjih raziskavah bi lahko preverili vpliv več različnih proteinov APOBEC3 hkrati na retrotranspozicijo LINE-2 retrotranspozonov ter morebitno porast inhibitornega učinka v primerjavi s posameznim proteinom. Pri tem bi uporabili tiste proteine, za katere je že znano, da inhibirajo retrotranspozicijo v največji meri. Največji napredek pa bi bil v odkritju mehanizma inhibicije retrotranspozicije, po katerem delujejo proteini APOBEC3 na LINE-2 retrotranspozone. Odkritje natančnega mehanizma inhibicije bi vodilo v razvoj rekombinantnih proteinov, ki bi jih lahko uporabili za zdravljenje nekaterih genetskih bolezni, ki jih povzročajo LINE retrotranspozoni. Uporaba rekombinantnih proteinov APOBEC3 bi ojačala učinek proteinov APOBEC3, ki so že prisotni v organizmu človeka. Odkritje mehanizma, po katerem proteini APOBEC3 inhibirajo retrotranspozicijo pa bi vodilo tudi v poznavanje fiziološke vloge proteinov APOBEC3 v organizmu, kar bi pomagalo pri optimizaciji protivirusnih terapij.

7 LITERATURA

- 1) Bennetzen J.L: Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology*, 42 (1), 2000; 251-269
- 2) Kidwell M.G, Lisch D.R: Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution*, 55 (5), 2001; 1-24
- 3) Kazazian H.H.: Mobile elements and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8 (3), 1998; 343-350
- 4) Prak E.T.L, Kazazian H.H: Mobile elements and the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 1 (2), 2000; 134-144
- 5) Kumar A, Bennetzen J.L: Retrotransposons: central players in the structure, evolution and function of plant genomes. *Trends in Plant Science*, 5 (12), 2000; 509-510
- 6) Lander E.S, et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 2001; 860–921
- 7) Kumar A, Bennetzen J.L: Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics*, 33, 1999; 479-532
- 8) Brouha B, Schustak J, Badge R.M, Lutz-Prigge S, Farley A.H, Moran J.V, Kazazian H.H Jr: Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *PNAS*, 100, 2003; 5280-5285
- 9) Ostertag E.M, Kazazian H.H.Jr: Biology of mammalian 11 retrotransposons. *Annual Review of Genetics*, 35, 2001; 501-538
- 10) Burton F.H, Loeb D.D, Voliva C.F, Martin S.L, Edgell M.H, Hutchison C.A 3rd: Conservation throughout mammalia and extensive protein-encoding capacity of the highly repeated DNA long interspersed sequence one. *Journal of molecular biology*, 187 (2), 1986; 291-304
- 11) Lovšin N: Molekularna evolucija non-LTR retrotranspozonov pri vretenčarjih. Doktorska disertacija, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2003
- 12) International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 2001, 860-921
- 13) Kajikawa M, Okada N: LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence. *Cell*, 111 (3), 2002; 433-44

- 14)** Suganoa T, Kajikawaa M, Okada N: Isolation and characterization of retrotransposition-competent LINEs from zebrafish. *Gene*, 365, 2006; 74-82
- 15)** Kapitonov V.V, Jurka J: CR1-1_DR, a family of CR1-like non-LTR retrotransposons in zebrafish. *Rephbase Reports*, 2 (4), 2002; 6
- 16)** Luan D.D, Korman M.H, Jakubczak J.L, Eickbush T.H: Reverse Transcription Of R2Bm RNAIs Primed By A Nick At The Chromosomal Target Site – A Mechanism For The Non-Ltr Retrotransposition. *Cell*, 72, 1993; 595-605
- 17)** Ostertag E M, Madison B B, Kano H: Mutagenesis in rodents using the L1 retrotransposon, *Genome Biology*, 8 (Suppl 1): S16, 2007
- 18)** Esnault C, Maestre J, Heidmann T: Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature Genetics*, 24, 2000; 363 - 367
- 19)** Chiu Y, Greene W: Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. *Trends in Immunology*, 27 (6), 2006; 291-297
- 20)** Kazazian HH Jr, Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE: Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*, 332 (6160), 1988; 164-6
- 21)** Narita N, Nishio H, Kitoh Y, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M: Insertion of a 5' truncated L1 element into the 3' end of exon 44 of the dystrophin gene resulted in skipping of the exon during splicing in a case of Duchenne muscular dystrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, 91 (5), 1993; 1862-1867
- 22)** Miki Y, Nishisho I, Horii A, Miyoshi Y, Utsunomiya J, Kinzler K.W, Vogelstein B, Nakamura Y: Disruption of the APC gene by retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer research*, 52, 1992; 643-645
- 23)** Moran J.V, DeBerardinis R.J, Kazazian H.H.Jr: Exon Shuffling by L1 Retrotransposition. *Science*, 283 (5407), 1999; 1530 – 1534
- 24)** Kajikawa M, Ichiyanagi K, Tanaka N, Okada N: Isolation and Characterization of Active LINE and SINEs from the Eel. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (3), 2005; 673-682
- 25)** Carlson C.M, Dupuy A.J, Fritz S, Roberg-Perez K.J, Fletcher C.F, Largaespada D.A: Transposon Mutagenesis of the Mouse Germline. *Genetics*, 165, 2003; 243-256
- 26)** Myers J.S, Vincent B.J, Udall H, Watkins W.S, Morrish T.A, Kilroy G.E, Swergold G.D, Henke J, Henke L, Moran J.V, Jorde L.B, Batze M.A: A Comprehensive Analysis of

- Recently Integrated Human Ta L1 Elements. *The American Journal of Human Genetics*, 71 (2), 2002; 312-326
- 27)** Bestor T.H: Transposons reanimated in mice. *Cell*, 122 (3), 2005; 322-325
- 28)** Abbott A: Laboratory animals: The Renaissance rat. *Nature*, 428, 2004; 464-466
- 29)** Schumann G.G: APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition. *Biochemical Society Transactions*, 35, 2007; 637–642
- 30)** Cullen B.R: Role and Mechanism of Action of the APOBEC3 Family of Antiretroviral Resistance Factors. *Journal of Virology*, 80, 2006; 1067-1076
- 31)** Chiu Y.L, Greene W.C: The APOBEC3 Cytidine Deaminases: An Innate Defensive Network Opposing Exogenous Retroviruses and Endogenous Retroelements. *Annual Review of Immunology*, 26, 2008; 317-353
- 32)** Goila-Gaur R, Strebe K: HIV-1 Vif, APOBEC, and Intrinsic Immunity. *Retrovirology*, 5 (51), 2008
- 33)** Harris R.S, Liddament M. T: Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nature Reviews Immunology*, 4, 2004; 868-877
- 34)** Holmes R, Malim M, Bishop K: APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing?. *ScienceDirect*, 32, 3, 2007; 118-128
- 35)** Harris R.S, Bishop K.N, Sheehy A.M, Craig H.M, Petersen-Mahrt S.K, Watt I.N, Neuberger M.S, Malim M.H: DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*, 113 (6), 2003; 803-809
- 36)** Sire J, Quérat G, Esnault C, Priet S: Uracil within DNA: an actor of antiviral immunity. *Retrovirology*, 45, 2008
- 37)** Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J, Navaratnam N: An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics*, 79 (3), 2002; 285-296
- 38)** Chiu Y.L, Soros V.B, Kreisberg J.F, Stopak K, Yonemoto W, Greene W.C: Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature*, 435 (7038), 2005; 108-114
- 39)** Simpson L: RNA-editing – an evolutionary perspective. The RNA world (2nd edition), *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1999, 585-608
- 40)** Newman E.N, Holmes R.K, Craig H.M, Klein K.C, Lingappa J.R, Malim M.H, Sheehy A.M: Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Current Biology*, 15 (2), 2005; 166-170

- 41)** Marin M, Rose K.M, Kozak S.L, Kabat D: HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nature Medicine*, 9 (11), 2003; 1398-1403
- 42)** Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W, Greene W.C: HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Molecular Cell*, 12 (3), 2003; 591-601
- 43)** Mariani R, Chen D, Schröfelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, Münk C, Nymark-McMahon H, Landau N.R: Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*, 114 (1), 2003; 21-31
- 44)** Bogerd H.P, Wiegand H.L, Doeble B.P, Lueders K.K, Cullen B.R: APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Research*, 34 (1), 2006; 89-95
- 45)** Chen H, Lilley C.E, Yu Q, Lee D.V, Chou J, Narvaiza I, Landau N.R, Weitzman M.D: APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Current Biology*, 16 (5), 2006; 480-485
- 46)** Hulme A. E, Bogerd H. P, Cullen B. R, Moran J.V: Selective inhibition of Alu retrotransposition by APOBEC3G. *Gene*, 390 (1-2), 2007; 199-205
- 47)** Esnault C, Millet J, Schwartz O, Heidmann T: Dual inhibitory effects of APOBEC family proteins on retrotransposition of mammalian endogenous retroviruses. *Nucleic Acid Research*, 34 (5), 2006; 1522-1531
- 48)** Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T, Sata T, Tokunaga K: All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acid Research*, 35 (9), 2007, 2955-2964
- 49)** Kuhelj R, Renko M, Bevec T, Dolinar M, Gunčar G, Ivanovski G, Jerala R, Lovšin N, Župunski V: Biokemija v praksi: načela in tehnike, 3.izdaja, Ljubljana, 2003: 68-71, 73-74, 89-90, 96-97
- 50)** QIAprep® Miniprep handbook For purification of molecular biology grade DNA (Second edition), QIAGEN, 2006
- 51)** John Wiley and Sons, Inc: Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture; Basic protocol: Trypsinizing and subculturing cells from a monolayer; Support protocol 3: determining cell number and viability with a hemacytometer and trypan blue staining, Reagents and solutions, Commentary. Current protocols in cell biology online, 2004; 1 (1.1)

- 52) Moran J.V, Holmes S.E, Naas T.P, DeBerardinis R.J, Boeke J.D, Kazazian H.H. Jr: High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell*, 87, 1996; 917–927
- 53) <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>
- 54) <http://www.fermentas.com/catalog/reagents/x-galsolution.htm>