

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Matjaž DEŽELAK

**ŠTUDIJ MEHANIZMA PREPREČEVANJA
RETROTRANSPOZICIJE S PROTEINI APOBEC3**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Matjaž DEŽELAK

**ŠTUDIJ MEHANIZMA PREPREČEVANJA
RETROTRANSPOZICIJE S PROTEINI APOBEC3**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**STUDY OF INHIBITION MECHANISMS OF
RETROTRANSPOSITION WITH APOBEC3 PROTEINS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. V celoti je bilo opravljeno na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Dušana KORDIŠA in somentorstvom dr. Nike LOVŠIN.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentor: doc. dr. Dušan KORDIŠ

Inštitut Jožef Stefan, Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti

Somentor dr. Nika LOVŠIN

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za biokemijo

Datum zagovora: 24. december 2009

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Matjaž DEŽELAK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.2:612(043.2)=163.6
KG citidinske deaminaze/proteini APOBEC/retrotranspozoni/retrotranspozicija/
inhibicija retrotranspozicije/hipermutacija
AV DEŽELAK, Matjaž
SA KORDIŠ, Dušan (mentor)/ LOVŠIN, Nika (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111
LI 2009
IN ŠTUDIJ MEHANIZMA PREPREČEVANJA RETROTRANSPOZICIJE S
PROTEINI APOBEC3
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIII, 85 str., 2 pregl., 32 sl., 170 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Retrotranspozoni so mobilni genetski elementi, ki se vključijo v genom gostiteljske celice, pomnožujejo pa se preko RNA transkripta, iz katerega se informacija zopet prepiše v DNA s pomočjo reverzne transkriptaze. Proteini APOBEC3 (eng. apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like editing complex 3") sodijo v družino proteinov APOBEC, katerim je skupna citidin deaminazna aktivnost, tj. kataliza deaminacije citozina v uracil v verigah DNA in/ali RNA. V okviru diplomskega dela smo preverili vpliv proteinov A3 in proteina A1 ter vpliv njihovih mutant na retrotranspozicijo elementov LINE-1 in ZfL2. Hitrost retrotranspozicije smo primerjali v HeLa celicah z uporabo označenega retrotranspozona v plazmidnem vektorju pCEP4 v prisotnosti posameznih proteinov APOBEC, ki smo jih v celice vnesli v plazmidnem vektorju pcDNA6. Že v predhodnih raziskavah je bilo ugotovljeno, da proteini APOBEC ne inhibirajo retrotranspozicije po mehanizmu deaminacije citozina v uracil, zato je bil naš namen preveriti, ali je encimsko aktivna domena kljub temu potrebna oz. če je kljub temu potrebna intaktna katalitična regija te domene. Najprej smo pripravili točkovne mutante ter jih poleg intaktnih proteinov vsakega posebej transficirali v sesalske celice 293T. Lizate celic smo v nadaljevanju analizirali s poliakrilamidno elektroforezo in s prenosom po Westernu preverili ekspresijo. Nato smo v celice vnesli zapis za posamezen protein A3 skupaj z zapisom za označen retrotranspozon in spremljali inhibitorne učinke posameznega proteina na retrotranspozicijo. Inhibitoren vpliv na retrotranspozicijo elementa LINE-1 so pokazali A3A, A3F in A3G, nobenega vpliva niso pokazali A3B, N-A3B in A3C, medtem ko sta mA3 in A1 retrotranspozicijo pospešila – prvi rahlo, drugi pa zelo močno. V primeru retrotranspozona ZfL2 so bili inhibitorni A3A, A3G, A3F, A3C in mA3, močna pospešitev aktivnosti pa je bila opažena pri mutiranem A3A (na 72-em mestu alanin namesto glutaminske kisline), A3B, mutiranem A3B (na 68-em mestu glutamin namesto glutaminske kisline) in A1. Dobljeni rezultati kažejo, da je za uspešno inhibicijo retrotranspozicije potrebna intaktna CDA domena.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.2:612(043.2)=163.6
CX cytidine deaminases/APOBEC proteins/retrotransposons/retrotransposition/
inhibition of retrotransposition/hypermutation
AU DEŽELAK, Matjaž
AA KORDIŠ, Dušan (supervisor)/LOVŠIN, Nika (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2009
TI STUDY OF INHIBITION MECHANISMS OF RETROTRANSPOSITION WITH
APOBEC3 PROTEINS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIII, 85 p., 2 tab., 32 fig., 170 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Retrotransposons are mobile genetic elements that are incorporated into host cell genome. Their retrotransposition include RNA intermediate from which information is transcribed into DNA by enzyme reverse transcriptase. We have studied the inhibitory effect of A3 proteins and A1 protein as well as the mutated form of A3A and A3B on LINE-1 and ZfL2 retrotransposition. In HeLa cells we rated the decrease of marked retrotransposon activity integrated in plasmid vector pCEP4 in the presence of APOBEC proteins that were transfected as a part of pcDNA6 vector. Previous studies revealed that APOBEC inhibitory activity on LINE-1 and ZfL2 retrotransposition do not include cytidine deaminase activity; therefore we were not sure if CDA domain is still necessary for the inhibition, or if the CDA region of this domain should maintain intact. Thus we constructed point mutants, and, along with the intact proteins, transfected them into 239T cells. We analysed cell lysates with polyacrilamide electrophoresis and examined expression with Western blot. Then we cotransfected HeLa cells with retrotransposon plasmid and APOBEC plasmid, and observed the inhibitory effects of separated APOBECs on retrotransposition rate. In the case of LINE-1 inhibitory effect on retrotransposition was observed by A3A, A3F and A3G, no effect by A3B, N-A3B and A3C and accelerated effect by mA3 and A1 – first modestly, whereas the second one greatly. Retrotransposition of the ZfL2 was inhibited by A3A, A3G, A3F, A3C and mA3, but highly accelerated by mutated A3A (alanine instead of glutamic acid on point 72), A3B, mutated A3B (glutamine instead of glutamic acid on point 72) and A1. This results show that intact CDA domain is necessary for efficient inhibition of retrotransposition.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska vsebina.....	II
Key word documentation.....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo slik.....	VIII
Kazalo tabel.....	X
Okrajšave in simboli.....	XI
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 NAMEN DELA.....	1
1.3 HIPOTEZE.....	1
1.4 UPORABNOST REZULTATOV	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 CITIDINSKE DEAMINAZE (CDAs).....	3
2.1.1 Proteini APOBEC.....	4
2.1.1.1 Aktivacijsko-inducirana citidinska deaminaza (AID).....	4
2.1.1.2 APOBEC1 (A1).....	5
2.1.1.3 APOBEC2 (A2).....	5
2.1.1.4 APOBEC3 (A3).....	5
2.1.1.4.1 APOBEC3A (A3A).....	6
2.1.1.4.2 APOBEC3B (A3B).....	7
2.1.1.4.3 APOBEC3C (A3C).....	7
2.1.1.4.4 APOBEC3D/E (A3D/E).....	7
2.1.1.4.5 APOBEC3F (A3F).....	8
2.1.1.4.6 APOBEC3G (A3G).....	8
2.1.1.4.7 APOBEC3H (A3H).....	8
2.1.1.5 APOBEC4 (A4).....	8
2.2 RETROELEMENTI (RETROTRANSPOZONI) IN RETROTRANSPOZICIJA.....	9
2.2.1 Retrotranspozoni LTR.....	12
2.2.2 Retropozoni.....	13

2.2.2.1	Elementi SINE.....	14
2.2.2.2	Elementi LINE.....	15
2.3	VLOGA APOBEC3 PROTEINOV V ORGANIZMU.....	16
2.3.1	Inhibicija virusne replikacije.....	17
2.3.2	Inhibicija retrotranspozicije.....	21
3	MATERIALI IN METODE.....	24
3.1	MATERIALI.....	24
3.1.1	Reagenti.....	24
3.1.2	Kemikalije.....	25
3.1.3	Raztopine in geli.....	26
3.1.4	Topila.....	28
3.1.5	Encimi.....	28
3.1.6	Protitelesa.....	28
3.1.7	Kompleti (kits).....	29
3.1.8	Oligonukleotidi.....	29
3.1.9	Plazmidi in celice.....	30
3.1.10	Laboratorijska oprema.....	32
3.2	METODE.....	33
3.2.1	Delo z DNA in bakterijami.....	33
3.2.1.1	Restrikcija.....	33
3.2.1.2	Agarozna elektroforeza.....	33
3.2.1.3	Izolacija DNA iz agarognega gela.....	34
3.2.1.4	Ligacija.....	34
3.2.1.5	Transformacija.....	35
3.2.1.6	Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih celic ("minipreparacija").....	35
3.2.1.7	Spektrofotometrično določanje koncentracije plazmidne DNA.....	36
3.2.1.8	Točkovna mutageneza.....	37
3.2.1.9	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	39
3.2.2	Delo s sesalskimi celicami.....	39
3.2.2.1	Odmrzovanje in zamrzovanje celic.....	39
3.2.2.2	Gojenje sesalskih celic.....	40

3.2.2.3	Vzdrževanje nesmrtnih celičnih linij s precepljanjem.....	41
3.2.2.4	Transfekcija.....	41
3.2.2.5	Priprava lizata celic.....	42
3.2.2.6	Poliakrilamidna gelska elektroforeza z dodatkom natrijevega dodecilsulfata (NaDS-PAGE).....	42
3.2.2.7	Prenos po Westernu (WB, eng. Western Blot).....	43
3.2.2.8	Ugotavljanje najmanjše učinkovite koncentracije genetičina.....	44
3.2.2.9	Ugotavljanje stopnje retrotranspozicije.....	45
4	REZULTATI.....	47
4.1	SUBKLONIRANJE.....	47
4.2	EKSPRESIJA PROTEINOV APOBEC.....	50
4.2.1	Učinkovitost transfekcije.....	50
4.2.2	Učinkovitost ekspresije proteinov APOBEC.....	51
4.3	STOPNJA RETROTRANSPOZICIJE.....	52
4.3.1	Stopnja retrotranspozicije ob prisotnosti nemutiranih proteinov APOBEC.....	53
4.3.2	Stopnja retrotranspozicije ob prisotnosti mutiranih proteinov APOBEC.....	57
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	61
5.1	RAZPRAVA.....	61
5.1.1	Ekspresija APOBEC3 proteinov.....	61
5.1.2	Stopnja retrotranspozicije.....	62
5.1.2.1	Stopnja retrotranspozicije ob prisotnosti nemutiranih proteinov APOBEC.....	62
5.1.2.2	Stopnja retrotranspozicije ob prisotnosti mutiranih proteinov APOBEC.....	64
5.2	SKLEPI.....	66
6	POVZETEK.....	67
7	LITERATURA.....	69

KAZALO SLIK

sl. 1	Predlagan mehanizem s CDA posredovane citozinske deaminacije.....	3
sl. 2	Velikost človeških proteinov APOBEC ter organizacija njihovih domen.....	4
sl. 3	Organizacija domen proteinov A3 in njihova relativna lokacija na človeškem kromosomu 22.....	6
sl. 4a	Shematski prikaz strukture človeških aktivnih in neaktivnih mobilnih elementov.	9
sl. 4b	Razdelitev in shematska zgradba retrotranspozonov.....	12
sl. 5	Mehanizem na tarčnem mestu začete reverzne transkripcije.....	15
sl. 6	Shematski prikaz zgradbe retrotranspozona ZfL2.....	16
sl. 7	Vključitev proteina A3 v nastajajoče virione.....	17
sl. 8	Delovanje proteina A3 v tarčni celici.....	18
sl. 9	Nevtralizacija delovanja proteina A3 s strani proteina Vif.....	20
sl. 10	Model dvojnega učinka aktivnosti proteinov APOBEC na retrotranspozicijo.....	23
sl. 11	Shematski prikaz vektorja pcDNA TM 3.1D/V5-His-TOP ^O	30
sl. 12a	Shematski prikaz vektorja pcDNA6/myc-His/ <i>lacZ</i> ^O	30
sl. 12b	Shematski prikaz vektorja pCEP4.....	31
sl. 13	Potek minipreparacije z uporabo QIAprep [®] Spin Miniprep Kita.....	36
sl. 14	Shematski prikaz točkovne mutageneze z uporabo kompleta QuikChange II-E Site-Directed Mutagenesis Kit.....	38
sl. 15	Shematski prikaz principa določanje hitrosti retrotranspozicije.....	45
sl. 16	Shematski prikaz poteka subkloniranja.....	47
sl. 17	Slika agarozne elektroforeze produkta PCR (A3B).....	48
sl. 18	Slika agarozne elektroforeze restrikcije plazmida pcDNA6/ <i>lacZ</i>	48
sl. 19	Slika agarozne elektroforeze vzorcev restrikcije kloniranih plazmidov.....	49
sl. 20	Prikaz celic HeLa, v katerih se je izrazil zeleni fluorescenčni protein GFP, pod mikroskopom po osvetlitvi z UV svetlobo.....	50
sl. 21	Analiza ekspresije proteinov A3 v sesalskih celicah 293T s prenosom po Westernu.....	52

sl. 22	Aktivnost retrotranspozona LINE-1 ob prisotnosti proteinov A1, A3C, A3F, A3G in mA3 oz. praznega vektorja.....	54
sl. 23	Aktivnost retrotranspozona LINE-1 ob prisotnosti proteinov A3A in A3B oz. praznega vektorja.....	54
sl. 24	Aktivnost retrotranspozona ZfL2 ob prisotnosti proteinov A1, A3C, A3F, A3G in mA3 oz. praznega vektorja.	55
sl. 25	Aktivnost retrotranspozona ZfL2 ob prisotnosti proteinov A3A in A3B oz. praznega vektorja.....	56
sl. 26	Aktivnost retrotranspozona ZfL2 ob prisotnosti proteinov A1, A3C, A3G in mA3 oz. praznega vektorja.....	56
sl. 27	Prikaz stopnje retrotranspozicije posameznega retrotranspozona ob prisotnosti posameznih proteinov APOBEC glede na retrotranspozicijo pri kotransfekciji s praznim vektorjem pcDNA6.....	57
sl. 28	Aktivnost retrotranspozona LINE-1 ob prisotnosti proteinov mut-A3A, mut-A3B in N-A3B oz. praznega vektorja.....	58
sl. 29	Aktivnost retrotranspozona ZfL2 ob prisotnosti proteinov mut-A3A, mut-A3B in N-A3B oz. praznega vektorja.....	59
sl. 30	Prikaz stopnje retrotranspozicije posameznega retrotranspozona ob prisotnosti posameznih točkovnih mutant proteinov APOBEC glede na retrotranspozicijo pri kotransfekciji s praznim vektorjem pcDNA6.....	60

KAZALO TABEL

pregl. 1 Povzetek virusne inhibicije s proteini A3.....	21
pregl. 2 Povzetek inhibicije retrotranspozonov s proteini A3.....	22

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

293T	embrionalne človeške ledvične celice 293T, opremljene z velikim T-antigenom virusa SV40
6-well plošča	plošča s šestimi vdolbinicami
A	adenin
A3	APOBEC3 proteini
AAV	nepatogen virus, ki se replicira v odvisnosti od adenovirusov ("adeno-associated virus")
AID	aktivacijsko-inducirana (citidinska) deaminaza
Anti-HA	protitelesa proti hemaglutinin epitopu
APOBEC	"apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like editing complex"
APS	amonijev persulfat
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin
C	citozin
CD	katalitična domena
CDAs	citidinske deaminaze
cDNA	komplementarna DNA
Cys	cistein
d	deoksi (npr. dc = deoksicitozin)
de novo	na novo, ponovno, od začetka
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>
EDTA	etilendiamintetraetanojska kislina; učinkovit kelator kovinskih kationov
EIAV	konjski infektivni anemični virus
FBS	fetusni serum goveda
G	gvanin

G418	antibiotik geneticin
Gag	glavni strukturni protein retrovirusne kapsule
Glu	glutamin
h	človeški (npr. hA3G = človeški A3G)
H⁺	proton, vodikov kation
HBV	hepatitis B virus
HeLa	rakave celice ustja materničnega vrata iz leta 1951
HERV	človeški endogeni retrovirus
HindIII	restriktijski encim, ki reže palindromsko DNA sekvenco AAGCTT med obema adeninoma ; izvorno izoliran iz bakterije <i>Haemophilus influenzae</i>
His	histidin
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti
HMM	kompleks z veliko molekularno maso
HO⁻	hidroksidni anion
HRP	hrenova peroksidaza
IAP	intracisternski A delec; vrsta mišjega retrotranspozona LTR
IFN-α	interferon alfa
IL-2	interlevkin 2
kbp	kilobazni par
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertanijev medij
LBA	Luria-Bertanijev medij z dodanim ampicilinom
LINE	dolga razpršena ponavlajoča se nukleotidna zaporedja
LMM	kompleks z nizko molekularno maso
LTR	dolge končne ponovitve
m	mišji (npr. mA3 = mišji A3)
MLV	mišji levkemični virus
mRNA	informacijska RNA
MusD	vrsta mišjega endogenega retrovirusa
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna elektroforeza ob prisotnosti natrijevega dodecilsulfata

NF-kappaB	proteinski kompleks, ki nadzira transkripcijo DNA
ORF	odprtji bralni okvir
PBS	fosfatni pufer z NaCl in KCl
PCR	verižna reakcija s polimerazo
primer	oligonukleotidni začetnik
Pro	prolin
retropozon	retrotranspozon brez dolgih končnih ponovitev
RIPA pufer	pufer za radioimunoprecipitacijsko analizo (eng. radioimmuno precipitation assay buffer)
RNA	ribonukleinska kislina
RT	reverzna transkriptaza
SIVagm	virus opiče imunske pomanjkljivosti, ki okuži vrste rodu <i>Chlorocebus</i>
SIVmac	virus opiče imunske pomanjkljivosti, ki okuži vrsto <i>Rhesus macaque</i>
SRP	delec, ki prepozna signal
TAE	tris-acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometan
Tween	anionski detergent polioksietilensorbitan
Ty1	vrsta glivnega retrotranspozona
U	uracil
UTR	neprevajana regija
Vif	pomožni protein virusa hiv
Vif	virusni infektivni faktor
Vpr	virusni protein R; regulacija vstopa HIV-1 predintegracijskega kompleksa v jedro
WB	prenos po Westernu
XhoI	restriktijski encim, ki reže palindromsko DNA sekvenco CTCGAG med prvim citozinom in timinom; izvorno izoliran iz bakterije <i>Xanthomonas holcicola</i>
ZfL2	element LINE-2 iz ribe navadna cebrica (<i>Danio rerio</i>)
Zn²⁺	dvovalentni kation cinkovega atoma

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Sesalski proteini APOBEC3 oz. "apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like editing complex 3" (A3) sodijo v družino citidinskih deaminaz (CDAs) in sodelujejo pri obrambi organizma proti nekaterim retrovirusom (npr. virusom HIV), pa tudi proti različnim retrotranspozonom. Retrotranspozoni so mobilni genetski elementi, ki tvorijo velik del genoma, pri človeku skoraj polovico. Kako proteini A3 preprečujejo retrotranspozicijo mobilnim genetskim elementom, še ni povsem razjasnjeno. Glavni predpostavljeni model inhibitornega delovanja proteinov A3 je deaminacija dC v dU med reverzno transkripcijo, vendar se je pokazalo, da encimska aktivnost ni neobhodno potrebna.

1.2 NAMEN DELA

Namen dela je ugotoviti, kateri proteini iz družine APOBEC zavirajo retrotranspozicijo ribjega retrotranspozona ZfL2, v kolikšni meri in ali je to odvisno od prisotnosti njihove intaktne domene oz. regije CDA.

1.3 HIPOTEZE

Postavljenе hipoteze temeljijo predvsem na rezultatih dosedanjih poskusov na elementih LINE-1 ("long-interspersed nuclear element 1"), predpostavljam pa, da bodo proteini A3 učinkovito inhibirali retrotranspozicijo tudi evolucijsko starejšega ribjega retrotranspozona ZfL2.

- ➔ Predpostavljam, da so proteini A3A, A3B, A3C, A3F, A3G, A1 in mA3 učinkoviti inhibitorji retrotranspozicije človeškega elementa L1 in ribjega elementa L2.
-

- ➔ Predpostavljam, da encimska aktivnost ni potrebna za inhibicijo, zato bodo točkovne mutante ohranile inhibitorni učinek.

1.4 UPORABNOST REZULTATOV

Rezultati naših raziskav bodo prispevali k boljšemu poznavanju fiziološke funkcije proteinov A3. Tako jih bomo lažje uporabili pri preprečevanju negativnih učinkov retrotranspozicije ter virusnih okužb. Trenutno so raziskovalci usmerjeni v odkrivanje mehanizma, s katerim bi lahko preprečili vpliv Vif (virusni infektivni faktor) na proteine A3 ter v način, s katerim bi preprečili rekrutacijo E3 ligaznega kompleksa. Proteini A3 delujejo inhibitorno tudi na replikacijski cikel mnogih drugih virusov, ki povzročajo bolezni. In nenazadnje, v prihodnosti bodo proteini A3 morda uporabni v genski terapiji pri zdravljenju bolezni, ki jih povzročajo retrotranspozoni.

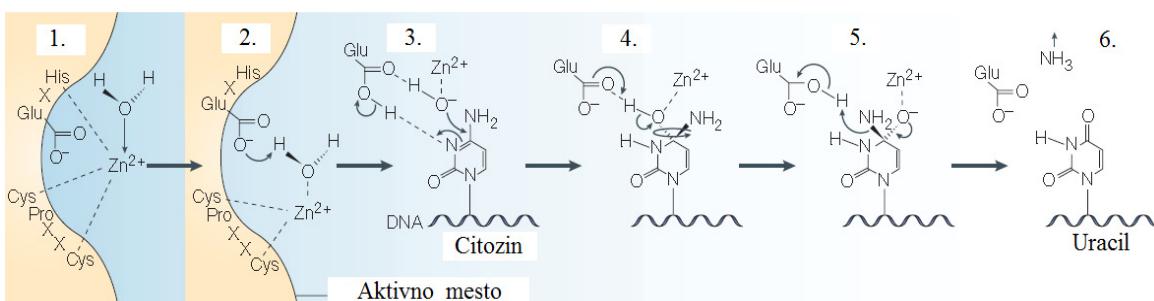
Napredek v poznavanju fizilogije proteinov A3 je nakazal nove možnosti izdelave zdravila oz. cepiva proti virusu HIV-1. Možnih je več pristopov, predmet raziskav pa so že naslednji:

- ⇒ identifikacija inhibitorjev z nizko molekulsko maso, ki selektivno preprečijo asociacijo proteina Vif s proteinom A3G oz. A3F, ali pa blokirajo rekrutacijo E3 ligaznega kompleksa. Tako bi se vzdrževala ustrezna, fiziološko aktivna koncentracija proteina A3 [76];
- ⇒ indukcija ekspresije A3G v T-celicah s kombinacijo fitohemaglutinina in IL-2 [76] oz. s forbolmiristat acetatom [126], v makrofagih pa z IFN- α [27]. S tem bi nadomestili delež proteina A3, ki ga Vif onesposobi oz. njegovo neto koncentracijo morda celo povečali.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CITIDINSKE DEAMINAZE (CDAs)

Citidinske deaminaze so encimi, ki katalizirajo deaminacijo citozina v uracil v verigah DNA in/ali RNA (slika 1). Najbolj znana je družina proteinov APOBEC (izpeljanka polnega angleškega imena "apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like editing complex"), ki vključuje ortologne genske družine AID (aktivacijsko inducirana deaminaza), APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3 in APOBEC4. Vsi člani družine posedujejo eno ali dve kopiji aminokislinskega motiva His/Cys-X-Glu-X₂₃₋₂₈-Pro-Cys-X₂₋₄-Cys, kjer X predstavlja katerokoli aminokislino, ki je karakteristična za določeno skupino proteinov družine APOBEC (slika 2). Posamezna takšna regija koordinira en Zn²⁺ ion v aktivnem mestu, kjer igra osrednjo vlogo pri predlaganem katalitičnem mehanizmu. V tem predelu so tudi glutamatni ostanek, potreben za protonsko izmenjavo ter dva aromatska ostanka, udeležena pri vezavi DNA oz. RNA substrata [1-7].



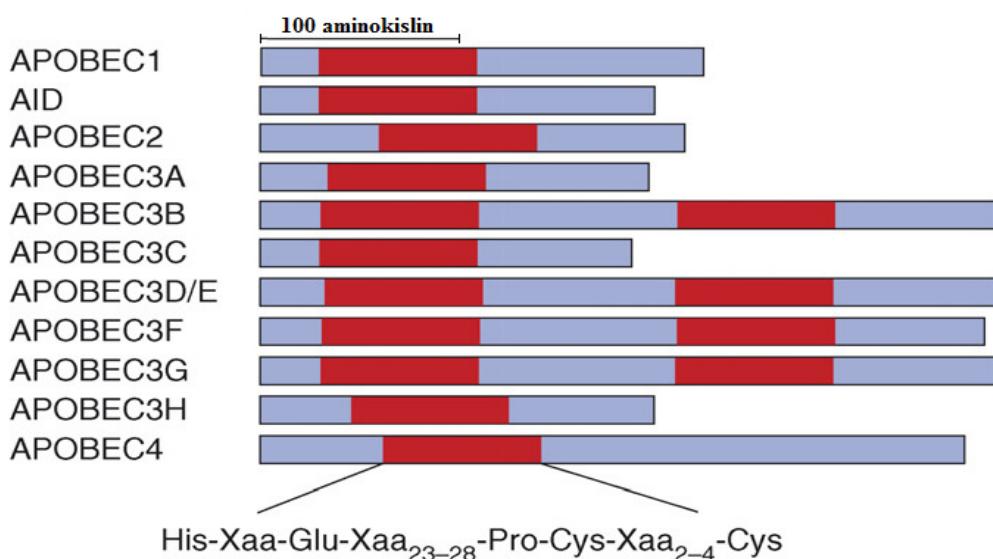
Slika 1: **Predlagani mehanizem s CDA posredovane citozinske deaminacije [33: 870].** Model je postavljen na osnovi strukturnega proučevanja bakterijskih in glivnih CDAs. (1.) Najprej dva cisteinska (Cys) in en histidinski (His) ostanek z elektrostatskimi interakcijami fiksirata cinkov kation (Zn²⁺) v aktivnem mestu. Prikazana je tudi v naslednjih korakih udeležena molekula vode. (2.) Dalje se ob posredovanju Zn²⁺ tvori hidroksidni anion (HO⁻), ko molekula vode reagira z ostankom glutaminske kisline. (3.) V naslednjem koraku ostanek glutaminske kisline odda proton (H⁺) dušikovemu atomu (N3) na mestu 3 pirimidinskega obroča citozina. Navedeno destabilizira N3=C4 dvojno vez, s čimer postane omenjeni ogljikov atom dovzet za nukleofilni napad hidroksidnega iona. (4.) To rezultira v nastanku tetraedralnega intermediata, H⁺ pa se veže na ostanek glutaminske kisline. (5.) Proton v naslednji fazici tvori kovalentno kemijsko vez z dušikovim atomom amino skupine, vezane na C4, hkrati pa se prekine vez med omenjeno amino skupino in pirimidinskim obročem ter nastanek dvojne vezi med C4 in kisikovim atomom, ki je na začetku pripadal vodi. (6.) Reakcija je zaključena, uracil in amoniak se sprostita iz aktivnega mesta [33].

2.1.1 Proteini APOBEC

Evolucijske študije so pokazale, da sta AID in A2 evolucijsko starejša predstavnika družine APOBEC, proteina A1 in A3 pa sta nastala kasneje, njuna prisotnost pa je verjetno omejena izključno le na sesalce [36].

Sama družina APOBEC kaže veliko pestrost glede števila in strukture posameznih članov. Znotrajvrstne primerjave posameznih predstavnikov so pokazale, da je v genih za proteine APOBEC večje število nesinonimnih kot pa sinonimnih zamenjav baz, kar kaže, da na proteine APOBEC družine deluje relativno močan pozitivni selekcijski pritisk [35].

Slika prikazuje velikost človeških proteinov APOBEC ter organizacijo njihovih domen (slika 2).



Slika 2: **Velikost človeških proteinov APOBEC ter organizacija njihovih domen** [96: 119]. Rdeče so označeni CDA motivi. Spodaj je označeno ohranljeno zaporedje, prisotno v vsaki domeni CDA [96].

2.1.1.1 Aktivacijsko-inducirana citidinska deaminaza (AID)

Aktivacijsko-inducirana citidinska deaminaza se ekspresira v B-celicah in ima pomembno vlogo pri ustvarjanju raznolikosti protitelesnih genov. Sodeluje pri procesih somatske hipermutacije in genske preuređitve z deaminacijo citozina v molekuli DNA

imunoglobulinskega lokusa. Omenjeni procesi so integralni del modifikacijskih mehanizmov na nivoju DNA, ki vodijo razvoj vretenčarskega protitelesnega odziva na prisotnost patogenov [10, 11, 8, 12, 13, 14]. Še vedno je stvar razpravljanja, ali je njen substrat DNA ali RNA [103, 36]. Poleg ss-DNA ima sposobnost učinkovanja tudi na DNA-DNA in DNA-RNA hibride [53]. Novejši rezultati raziskav kažejo, da omejuje retrotranspozicijo elementa LINE-1 [164], kar kaže na njeno dvojno vlogo pri imunskega odzivu: sodeluje tako pri prirojeni kot tudi pri pridobljeni imunosti.

2.1.1.2 APOBEC1 (A1)

Protein A1 je bil prvi odkriti predstavnik CDAs. Primarno je udeležen v metabolizmu lipidov, ekspresira pa se v gastrointestinalih tkivih. Specifično spremeni citidinski ostanek na mestu 6666 (C6666) v mRNA molekuli apolipoproteina B (apoB) v uridinskega, s čimer se tvori pritezana oz. skrajšana, a funkcionalna oblika apoB [1, 8]. Izkazuje pa tudi druge fiziološke učinke. Najnovejše raziskave so pokazale, da človeški protein A1 deaminira (-)DNA virusa HBV tako učinkovito, kot to počne hA3G [170]. A v *in vivo* pogojih je ta njegova sposobnost brezpredmetna, saj se v človeških jetrih ne ekspresira [170]. Tudi podganji A1 (rA1) deluje protivirusno. pokazano je bilo, da rA1 močno zmanjša infektivnost virusov HIV-1, SIVmac, SIVagm in MLV [169]. Mišji A1 (mA1) pa je *in vivo* dokazano hipermutator tako molekule RNA kot ss-DNA [168].

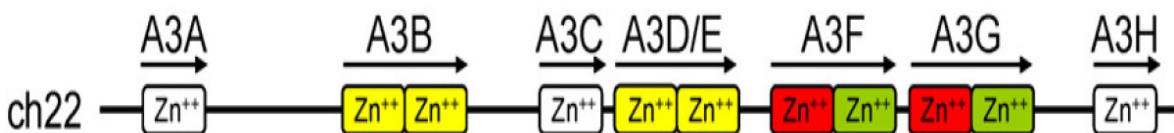
2.1.1.3 APOBEC2 (A2)

Protein A2 se najizraziteje ekspresira v srčni in skeletnih mišicah, reguliran pa je s strani NF- κ B [15, 16, 17]. Miši z izključenim genom za protein A2 niso pokazale nobene spremembe fenotipa [163], tako da fiziološka vloga A2 še ni pojasnjena.

2.1.1.4 APOBEC3 (A3)

Vseh 8 genov, ki kodirajo proteine A3, se pri človeku nahaja na kromosому 22 [32, 33] (slika 3) in so produkt tandemskih genskih podvojitev, nastalih z neenakim prekrižanjem (eng. crossing-over). Iz enega samega gena (takšno stanje je še danes pri miših, ki imajo le

en protein A3, imenovan mA3) je tekom genetske evolucije sesalcev nastalo 8 genov, ki jih danes najdemo pri primatih. Pri treh, A3B, A3F in A3G, je potekla še znotrajgenska duplikacija domene CDA [35, 36, 37, 38]. Sicer tudi protein A3D/E vsebuje dve domeni CDA, vendar v tem primeru ni potekla notranja genska duplikacija. Najprej se je domnevalo, da je gen za protein A3E psevdogen, sedaj pa je sprejeto mnenje, da A3D in A3E predstavlja N- in C-terminalno regijo enega proteina [39]. Pri proteinih A3 z dvema domenama CDA je običajno encimsko aktivna le ena, druga pa sodeluje pri vezavi retrovirusne oz. retrotranspozonske RNA ter pri inkorporaciji v retrovirione [32].



Slika 3: **Organizacija domen proteinov A3 in njihova relativna lokacija na človeškem kromosomu 22 [34: 76].** Domena CDA, vsebujoč Zn^{2+} vezavni motiv, je predstavljena kot okvirček. Razvidno je, da proteini A3 vsebujejo eno ali dve domeni CDA. Barva okvirčkov predstavlja stopnjo učinkovitosti proteina pri inhibiciji replikacije HIV. A3F in A3G (zeleni in rdeči okvirčki) kažeta največjo učinkovitost inhibicije, A3B in A3D/E (rumeni okvirčki) izkazujeta šibko stopnjo inhibicije, medtem ko je A2A, A3C in A3H (beli okvirčki) sploh ne [34].

Pri encimski aktivnosti C-terminalna domena proteina A3 determinira preference za hipermutacije tarčnega mesta [120, 121]. Tako naprimjer A3G prednostno deaminira dinukleotid 5'-CC, A3F pa dinukleotid 5'-TC [44, 79, 123, 124, 72, 73]. Protein A3 je lahko v celici samostojen (oblika LMM, eng. low-molecular mass complex) in encimsko aktivен. Če pa se poveže z nekaterimi molekulami RNA ter z RNA vezavnimi proteinimi (kot so proteini stresnih in Staufen granul ter proteini P telesc), nastane oblika HMM (eng. high-molecular mass complex), ki pa ni encimsko aktivna. V *in vitro* pogojih oblika HMM po obdelavi z RNAAzo preide v obliko LMM [154].

2.1.1.4.1 APOBEC3A (A3A)

Protein A3A se močno ekspresira v nezrelih monocitih [31], najdemo pa ga tudi v keratinocitih, vranici, celicah tankega črevesa ter pri pojavu kolorektalnega

adenokarcinoma, kronični mieloični levkemiji in Burkittovem limfomu [139]. *In vitro* poskusi so pokazali, da je zelo učinkovit inhibitor transpozicije retrotranspozonov LTR, vendar pa ne povzroča deaminacij citidinskih ostankov [20]. Ima pomembni lastnosti, in sicer specifičnost delovanja na enoverižno DNA ter sposobnost prehajanja jedrne ovojnice [72, 102].

2.1.1.4.2 APOBEC3B (A3B)

A3B se ekspresira v keratinocitih, celicah debelega in tankega črevesa [139], še posebej veliko pa ga je v raznolikih tipih rakavih celic, kot so naprimer pljučni karcinom, kolorektalni adenokarcinom, Burkittov limfom in kronična mieloična levkemija [31, 139]. Do neke mere je sposoben inhibirati replikacijo tako HIV/ ΔVif kot tudi divjega tipa HIV [72, 73, 74, 75], kar potrjuje tudi dejstvo, da se Vif ni sposoben vezati na A3B [63]. Opazno se ekspresira tudi v testisih, ovarijih in zarodnih celicah. Ker je sposoben preiti v jedro, se domneva, da ima tu vlogo preprečevanja dednih insercij elementov LINE-1 in *Alu* v zarodni celični liniji [20].

2.1.1.4.3 APOBEC3C (A3C)

Ekspresija proteina A3C je opazno v vranici, limfocitih periferne krvi, ovarijih in testisih. Inhibira replikacijo SIVmac/ ΔVif in SIVagm/ ΔVif , ne pa tudi HIV/ ΔVif . Inhibira tudi elemente LINE-1, a ne z encimsko aktivnostjo. Inhibicija elementov *Alu* je dvomljiva [25, 26, 27, 28, 29, 30, 96].

2.1.1.4.4 APOBEC3D/E (A3D/E)

Funkcionalen protein A3D/E je sestavljen iz dveh domen, A3D in A3E. Zapis za njiju ne predstavlja en gen, ampak sta domeni funkcionalno kodirani v samostojnih genih. Sta si pa lokusa, ki ta dva gena nosita, v neposredni bližini [39]. Natančnejša vloga A3D/E je še predmet raziskav.

2.1.1.4.5 APOBEC3F (A3F)

Kot A3C, najdemo tudi A3F v vranici, limfocitih periferne krvi, ovarijih in testisih [25, 26, 27, 28, 29, 30]. A3F, podobno kot A3G, močno inhibira replikacijo HIV/ ΔVif , ne pa tudi divjega tipa HIV. Dokaj uspešno inhibira tudi elemente LINE-1, a ne preko encimske aktivnosti [72, 73, 74, 75, 96].

2.1.1.4.6 APOBEC3G (A3G)

A3G je, tako kot sta A3C in A3G, prisoten v celicah vranice, ovarijev in testisov ter v limfocitih periferne krvi [25, 26, 27, 28, 29, 30]. Primarno se ekspresira tudi v limfoidnih in mieloidnih celičnih linijah, priželjcu, tonsilah, kostnem mozgu, maternici, možganih, srcu, pljučih, jetrih in ledvicah ter v nadledvični žlezi [139]. A3G deaminira le ssDNA, ne pa tudi DNA-DNA in DNA-RNA hibride [53]. A3G je najmočnejši inhibitor HIV replikacije [72, 73, 74, 75], več raziskovalnih skupin pa je pokazalo, da ne inhibira transpozicije človeških elementov LINE-1 [114, 21, 102, 141, 23, 24, 142].

2.1.1.4.7 APOBEC3H (A3H)

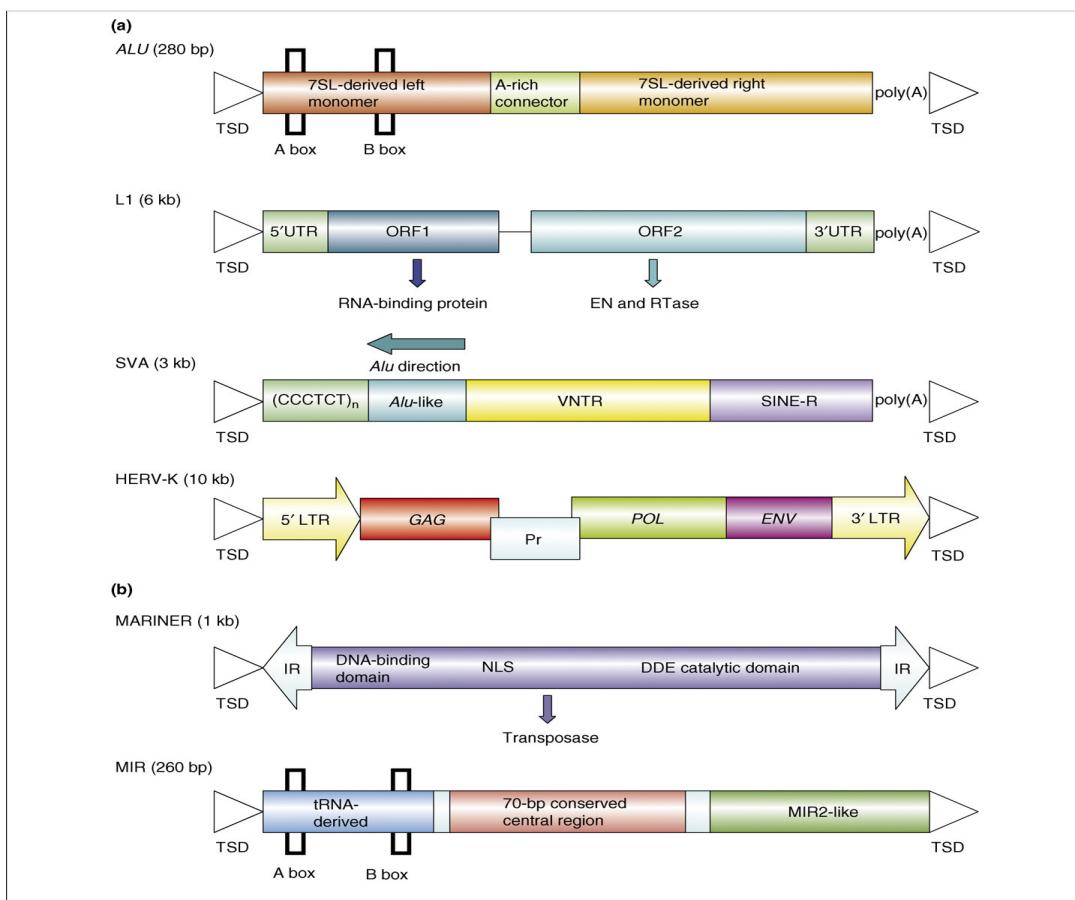
A3H je edini protein te družine, ki sploh ne oz. zelo slabo inhibira replikacijo virusov in retrotranspozonov, kar je verjetno posledica njegove nizke ekspresije v celicah [19, 96]. A kljub temu ga lahko v zaznavnih količinah najdemo v limfocitih periferne krvi, testisih, ovarijih, zarodkovih jetrih, koži, malih možganih ter v celicah tankega in debelega črevesa [139]. Njegova primarna vloga v organizmu še ni poznana.

2.1.1.5 APOBEC4 (A4)

A4 je zadnji odkriti predstavnik proteinske družine APOBEC, primarno pa se ekspresira v testisih [18]. Tudi njegova fiziologija še ni pojasnjena.

2.2 RETROTRANSPOZONI IN RETROTRANSPOZICIJA

Retrotranspozoni so mobilna zaporedja DNA, ki se po reverzni transkripciji ponovno vključijo v genom gostiteljske celice. Pomnožujejo se preko intermediata RNA, iz katerega se informacija s pomočjo encima reverzna traskriptaza prepiše v DNA v procesu, imenovanem retrotranspozicija. Njihov način replikacije imenujemo "kopiraj-in-prilepi, saj se njihovo število povečuje [89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96]. Poleg skupnih lastnosti, imajo člani posameznih skupin specifične lastnosti. Slika prikazuje shematsko zgradbo štirih nedavno aktivnih (tj. aktivnih v zadnjih 6 milijonih letih) ter dveh neaktivnih retrotranspozonov (slika 4a).



Slika 4a: Shematski prikaz strukture človeških aktivnih in neaktivnih mobilnih elementov [9: 186].
Struktura štirih nedavno aktivnih retrotranspozonov **(a)** in dveh neaktivnih **(b)**. DDE: ohranjeno zaporedje mariner transpozaze; IR: obrnjena ponovitev; LTR: dolgo terminalno zaporedje; MIR: med sesalci razširjena razpršena ponovitev; NLS: jedrno lokacijski signal; ORF: odprt bralni okvir; Pr: proteaza; SINE-R: kratki razpršeni ponavljanjoči element R; TSD: ponovitev tarčnega mesta; UTR: neprevajana regija; VNTR: variabilno število tandemskih ponovitev [9].

V grobem jih delimo v tri skupine: retrovirusi, retrotranspozoni z dolgimi končnimi ponovitvami (retrotranspozoni LTR) in retrotranspozoni brez dolgih končnih ponovitev (retropozoni) [89, 90, 91, 92]. Drugi avtorji predlagajo tudi drugačne delitve [165]. Pri sesalcih spada večina mobilnih genetskih elementov med retrotranspozone. Njihov delež pri človeku in miši je približno 45%, a od tega jih je manj kot 0,05% aktivnih še danes [89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96]. Kljub temu se po ocenah zgodi vsaj ena nova insercija na vsakih 10 do 100 živih rojstev [117, 122, 133].

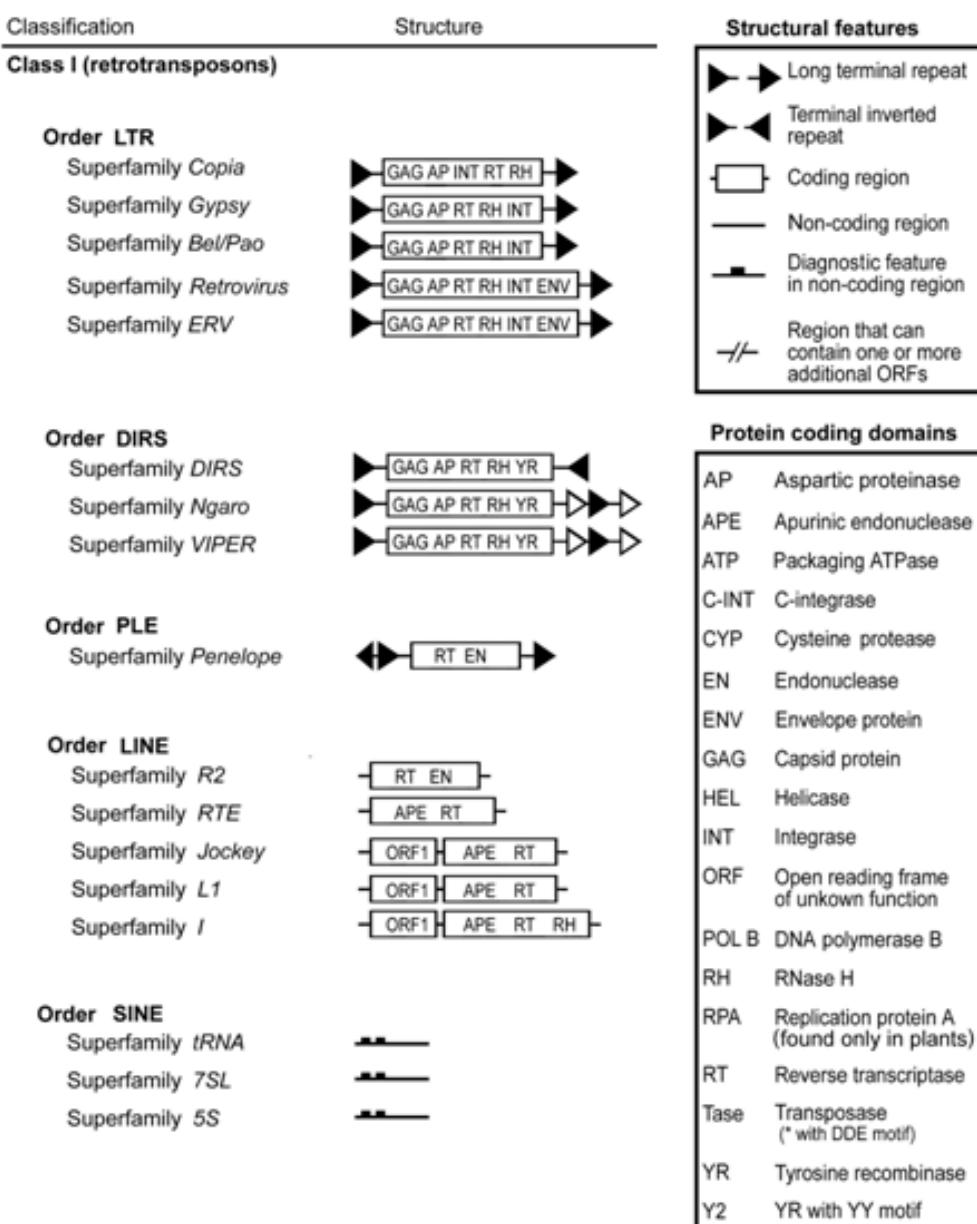
V organizmih so se pojavili že stotine milijonov let nazaj, danes pa so prisotni pri vseh evkariontih. Nanje lahko gledamo kot na neke vrste genomske parazite, čeprav lahko v redkih primerih gostitelju tudi koristijo. Če upoštevamo, da so mutageni dejavnik, ki izvaja insercijsko mutagenezo in posledično premeščanje DNA [94, 95, 104, 105], so v redkih primerih mutacije lahko koristne. Vendar so škodljive posledice mnogo pogostejše, zato so gostitelji razvili mehanizme, s katerimi omejujejo vključevanje mobilnih genetskih elementov na nova mesta v genomu. Takšni mehanizmi so: transkripcijsko utišanje z metilacijo DNA [106, 107], modifikacija strukture kromatina [106, 107], posttranskripcijsko utišanje preko RNA interference [108 – 113] ter mutacijska inaktivacija replikacijskih intermediatov skupaj z drugimi učinki, ki jih posredujejo proteini APOBEC [114 – 116].

Molekularna biologija in biotehnologija sta spoznali praktično uporabnost retrotranspozonov. Uporabimo jih lahko kot dejavnike insercijske mutageneze za utišanje genov, kar je uporabno pri razvoju živalskih modelov za študij človeških bolezni. Uporaba retrotranspozonov za insercijsko mutagenezo pa ima kar nekaj prednosti pred uporabo retrovirusov:

- ⇒ retrotranspozoni niso omejeni s številom mutacij, ki jih lahko povzročijo, saj se prenašajo preko mehanizma "kopiraj-in-prilepi". Z njimi povzročena mutageneza je visokofrekventna, kar omogoča doseganje idealnega stanja – ena mutacija na vsako zarodno celico. Tako se lažje ugotovi, katere mutacije so povezane s fenotipom [149, 150];
-

- ⇒ direktne mutacije v zarodnih celicah se prenašajo na potomce po naravni 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 [151];
- ⇒ 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 eksone in introne) lahko zmoti delovanje gena. To predstavlja velik napredek v primerjavi s kemijsko povzročenimi mutagenezami: le-te povzročajo točkovne mutacije, ki pogosto sploh ne vplivajo na funkcijo gena. Insercije, nastale z retrotranspozoni, pa so trajne in stabilne in možnosti, da bi se mutacije čez čas izgubile, ni [152];
- ⇒ insercije retrotranspozonov niso mestno specifične, temveč naključne. Najdemo jih na vsakem kromosому, tako v intronih kot tudi v DNA regijah z nizko ali visoko vsebnostjo GC parov [153];
- ⇒ nove lokacije, kjer je prišlo do insercije v genomu, se dajo enostavno ugotoviti s pomočjo inverzne verižne reakcije s polimerazo [149].

Slika prikazuje razdelitev in shematsko zgradbo retrotranspozonov (slika 4b).



Slika 4b: Razdelitev in shematska zgradba retrotranspozonov [167].

2.2.1 Retrotranspozoni LTR

Retrotranspozoni LTR so retrotranspozoni z dolgimi končnimi ponovitvami. Vsebujejo funkcionalni gen *pol*, ki kodira reverzno transkriptazo in integrazo. Poleg tega nosijo v genu *gag* tudi zapis za strukturni protein, ki omogoča oblikovanje virusom podobnih delcev. Translacija teh proteinov in retrotranspozicija potečeta v citoplazmi. Ob nastali cDNA se nato sintetizira komplementarna DNA veriga, in tako nastala dvojnična DNA

se skupaj z integrazo premakne v jedro. Tam poteče še zadnji korak v retrotranspozonovem replikacijskem ciklu: integraza katalizira vključitev DNA v gostiteljev genom [94, 95].

Najbolj preučeni predstavniki retrotranspozonov LTR so človeški HERVs, mišja IAP in MusD ter Ty1, prisoten pri kvasovkah [96].

Zaradi strukturnih in mehanizemskih podobnosti med retrovirusi in retrotranspozoni LTR, se postavlja vprašanje, ali so prvi produkt progresivne evolucije drugih, ali pa so retrotranspozoni nastali z regresivnimi evolucijskimi modifikacijami iz retrovirusov [95]. Danes je vedno bolj sprejeto mnenje, da so retrovirusi pri vretenčarjih nastali iz Metavirid, konkretno iz Ty3/gypsy skupine retrotranspozonov LTR [166].

2.2.2 Retropozoni

Retropozoni so retrotranspozoni brez dolgih končnih ponovitev. Delimo jih v elemente LINE (eng. long interspersed nuclear elements), SINE (eng. short interspersed nuclear elements), PLE in DIRS [167]. Prvi predstavniki so bili identificirani že v poznih 60. letih 20. stoletja [134], opaženi pa so bili le elementi z okrnjenim 5'-koncem in kot taki nedejavni [137]. Prvi aktivni pa so bili pri človeku najdeni šele kakšnih 20 let pozneje, ko so opazili primere transpozicije takih elementov v funkcionalne človeške gene, kar je povzročilo genetske bolezni [135, 136]. Retrotranspozicija L1 elementa v gen *F8*, ki nosi zapis za protein, imenovan faktor VIII, je privedla do nastanka hemofilije. Aktivne elemente SINE pa je bilo še težje odkriti, saj so ti neavtonomni, tj. odvisni od proteinov, ki jih kodirajo elementi LINE [136, 138].

Sesalske retropozone imenujemo tudi poliA+ retrotranspozoni, in sicer zaradi ponovitev adeninskih nukleotidov na koncu transpozonove mRNA (poli-A rep). Te ponovitve so posledica njihovega posebnega načina integracije v gostiteljev genom [140].

V človeškem genomu je približno 850 000 LINE in 1 500 000 elementov SINE, kar predstavlja skupaj približno 34% celotnega genoma. Zaporedje za reverzno transkriptazo,

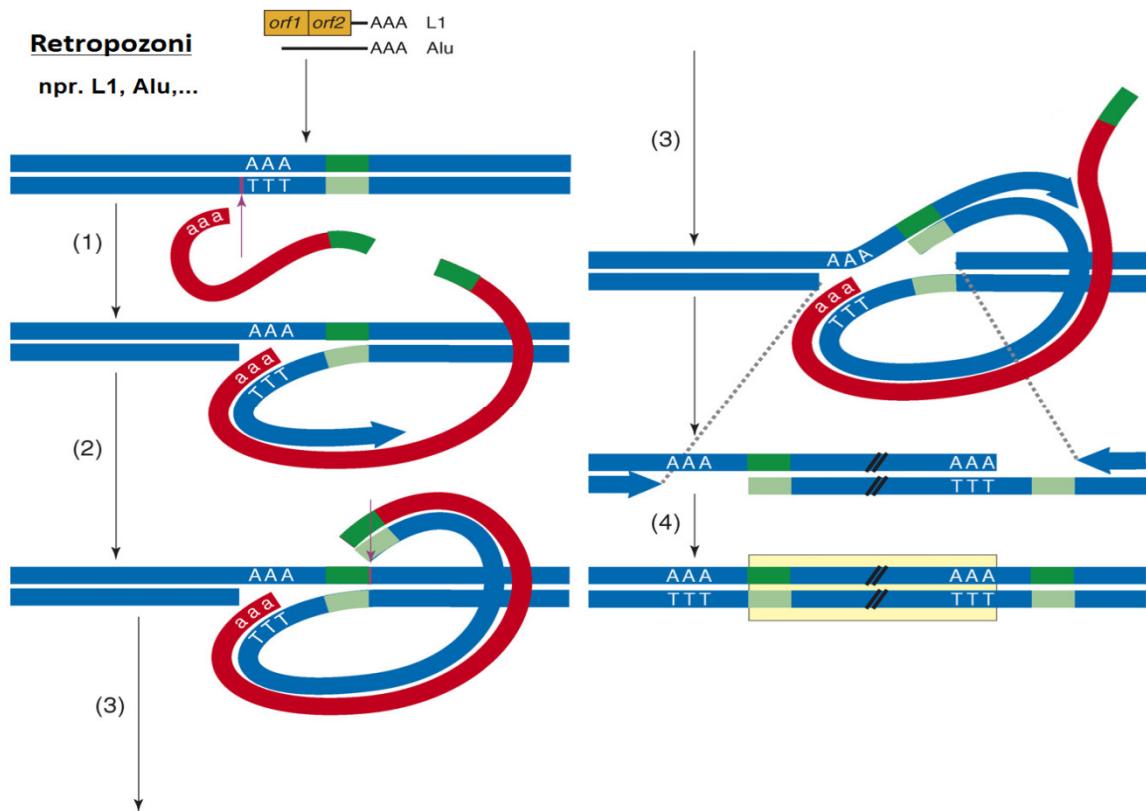
prisotno tako pri retrotranspozonih LTR kot pri retropozonih, je prevladujoče evkariotsko zaporedje DNA na Zemlji [91, 137].

2.2.2.1 Elementi SINE

Elementi SINE so kratki razpršeni jedrni elementi. Najpogostejsi človeški SINE je *Alu*, ki se prepisuje s pomočjo RNA polimeraze III. Pri tem nastane 300 bp dolga mRNA, ki je z informacijskega vidika nekodirajoča [101]. *Alu* element je neavtonomen in za podvajanje uporabi replikativne mehanizme elementa LINE-1. *Alu* mRNA se zasidra na ribosom, kjer počaka, da poteče translacija LINE-1 proteina ORF2. Tako preprosto zasede mesto LINE-1 mRNA. Predvideva se, da sidranje na ribosom posredujeta dva proteina, in sicer SRP9p in SRP14p (ki sta sicer komponenti proteinskega kompleksa "Signal Recognition Particle") [19].

Alu elementi so nastali v predniku primatov pred ~60 milijoni let, med evolucijo pa so bili predstavniki različnih poddržin aktivni v različnih obdobjih in v različni meri. Tako je sedaj njihova zastopanost pri človeku nekje 11%, pri čemer pa se evolucijski razvoj *Alu* zaporedij še vedno nadaljuje [92].

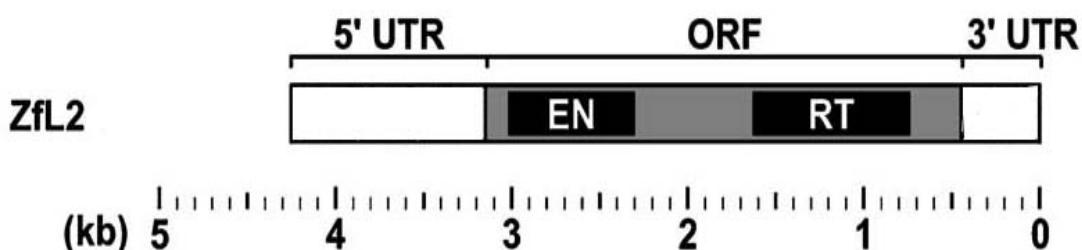
2.2.2.2 Elementi LINE



Slika 5: Mehanizem na tarčnem mestu začete reverzne transkripcije [96: 124]. Poteka v jedru neposredno na mestu integracije. Potankosti procesa niso znané, slika prikazuje le preprost shematski model. Rdeče je označena RNA, modro pa DNA. (1) Reverzna transkripcija se začne s prerezom ene verige genomske DNA (vijolična puščica) z retropozonovo endonukleazo na s timidini bogatem mestu. Na ta skupek timidinov se veže adeninska terminalna regija retropozonove RNA in sinteza cDNA se lahko prične. (2) Ko se sinteza prve DNA verige zaključi, se prereže še druga veriga (vijolična puščica), na mestu homologije (zeleno področje; temno zelena je smiselna sekvenca, svetlo zelena protismiselna) z integrirajočo verigo. (3) Ta homologna regija služi kot "primer" sinteze druge DNA verige, ki tekom sinteze sproti izpodriva RNA. (4) Na koncu se dogradijo še vrzeli in retropozon je integriran (rumen okvirček) [96].

Elementi LINE so dolgi razpršeni jadrni elementi. Za razliko od retrotranspozonov LTR ne kodirajo integraze, zato se tudi njihov način vključevanja v gostiteljski genom razlikuje. Na tarčnem mestu integraza prereže genomsko DNA, nastala skupina 3'-OH pa služi kot začetnik ("primer") njihovega podvajanja. Proses se imenuje "na tarčnem mestu začeta reverzna transkripcija" (eng. target-primed reverse transcription) (slika 5). Človeški LINE-1 se prepisuje s pomočjo RNA polimeraze II, s čimer nastane 6 kbp mRNA, ki nosi zapis za dva proteina, ORF1p in ORF2p, in ki sta oba potrebna za retrotranspozicijo. 5' neprevedljiva regija (UTR, eng. untranslated region) vsebuje skrajšano promotorsko regijo, 3' UTR regija pa nosi poli-A rep [97, 98, 92, 99, 100].

Med elemente LINE sodijo tudi elementi LINE-2. Našli so jih pri različnih vretenčarjih, pa tudi pri nevretenčarjih [144]. Pri človeku predstavljajo približno 3% genoma, a z razliko od LINE-1 so vse kopije neaktivne. Retrotranspozicijsko aktivne LINE-2 najdemo pri ribah [145], na katerih so bile opravljene vse dosedanje študije. Uporabljeni sta bila UnaL2 (predpona Una izvira iz besede `unagi`, kar je japonski izraz za jeguljo) ter ZfL2 (slika 6) (kratica Zf prihaja iz besede `zebrafish`, ki predstavlja vrsto ribe navadna cebrica (*Danio rerio*)) [146]. Oba imata le en odprt bralni okvir, ki kodira endonukleazno in RT domeno. Obe sta nujno potrebni za uspešno retrotranspozicijo, poleg njiju pa je nujna tudi 3' UTR regija [147, 148]. To se je pokazalo v študiji z elementom UnaL2, ko so mutacije na 3' koncu retrotranspozona močno zmanjšale frekvenco retrotranspozicije, več kot je bilo ponovitev TGTAA, uspešnejša je bila [147]. Razlika v stopnji retrotranspozicije obstaja tudi med omenjenima ZfL2 elementoma: aktivnost ZfL2 je približno 30-krat večja [146].



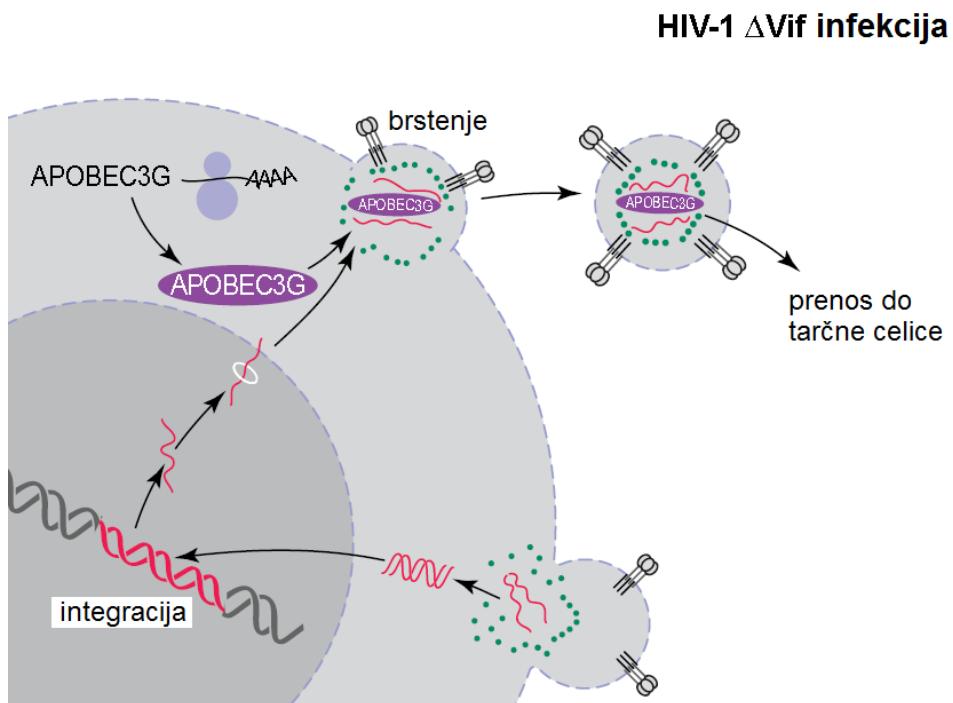
Slika 6: Shematski prikaz zgradbe retrotranspozona ZfL2 [148: 77]. Dolg je približno 4250 bp, in ima samo en odprt bralni okvir (ORF), ki nosi zapis za enoten protein z dvema domenama. Ena ima endonukleazno (EN), druga reverzno transkriptazno (RT) aktivnost. Na vsaki strani ORF sta 5' in 3' neprevedljivi regiji (UTR) [148].

2.3 VLOGA PROTEINOV A3 V ORGANIZMU

Proteini A3 imajo v organizmu dve pomembni vlogi: obrambo pred nekaterimi virusi (predvsem pred retrovirusi) in inhibicijo aktivnosti retroelementov. Obema procesoma je skupna reverzna transkripcija, in prav nanjo proteini A3 tudi delujejo [20, 21, 22, 23, 24].

2.3.1 Inhibicija virusne replikacije

V odsotnosti proteina Vif se A3F in A3G vključita v novonastale virione preko interakcije z nukleokapsidno komponento poliproteina gag in/ali virusne genomske RNA (slika 7) [40, 41, 42, 43].

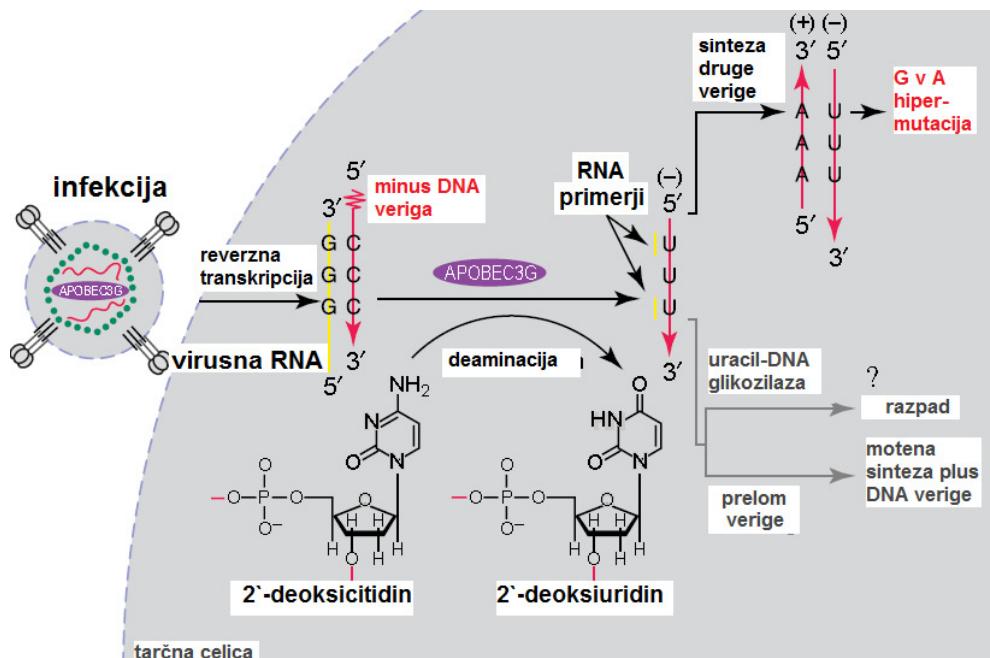


Slika 7: **Vključitev proteina A3 v nastajajoče virione [52: 292].** V odsotnosti Vif proteina se A3G uspešno inkorporira v novonastajajoče virione ter se tako prenese do tarčnih celic virusa [52].

Protein A3 se tako skupaj z virusom prenese v tarčno celico virusa. Sledi vstop virusa v celico ter njegovo slačenje, temu pa reverzna transkripcija in sinteza (-)cDNA [49, 50, 51]. Tekom tega procesa pride do interakcije med proteinom A3 in novonastajajočo (-)cDNA, s čimer je proteinu A3 omogočena kataliza deoksicitidinskega ostanka v deoksiuridinskega (slika 8). Deaminacija se izvrši vzdolž celotne verige, frekvenca mutacij pa narašča v smeri 5' → 3' [53, 54], saj 3' regija (-)cDNA ostane tekom dograjevanja verige (+)DNA najdlje enoverižna [118].

Hipermutacije dC v dU imajo dve posledici. Prvič, uracili v DNA niso tolerirani, zato jih odstrani uracil-DNA glikozilaza, tako dobljene koščke DNA pa nadalje razgradi apurinska-apirimidinska endonukleaza-1 [55, 56]. Drugič, četudi mutirana DNA ne razpade in se

integrira v genom gostiteljske celice, skoraj zagotovo nosi zapis za nefunkcionalne virusne proteine. Tako lahko pride po transkripciji integrirane DNA do alternativnega izrezovanja (eng. alternative splicing) mRNA ali pa do prezgodnje terminacije (eng. premature termination) [51]. Rezultat mutacije G → A kodona TGG je nastanekenega izmed treh možnih kodov: TAG, TAA ali TGA, ki so vsi terminacijski kodoni translacije [53].



Slika 8: **Delovanje proteina A3 v tarčni celici** [52: 292]. Protein A3 povzroči obsežne deaminacije 2'-deoksicitidinskih ostankov (-)cDNA verige. To ima lahko za posledico dG v dA mutacije v kasneje nastali verigi (+)DNA, ali pa se zgodi razpad uracil vsebujoče (-)DNA verige s pomočjo uracil-DNA glikozilaze in apurinske-apirimidinske endonukleaze [52].

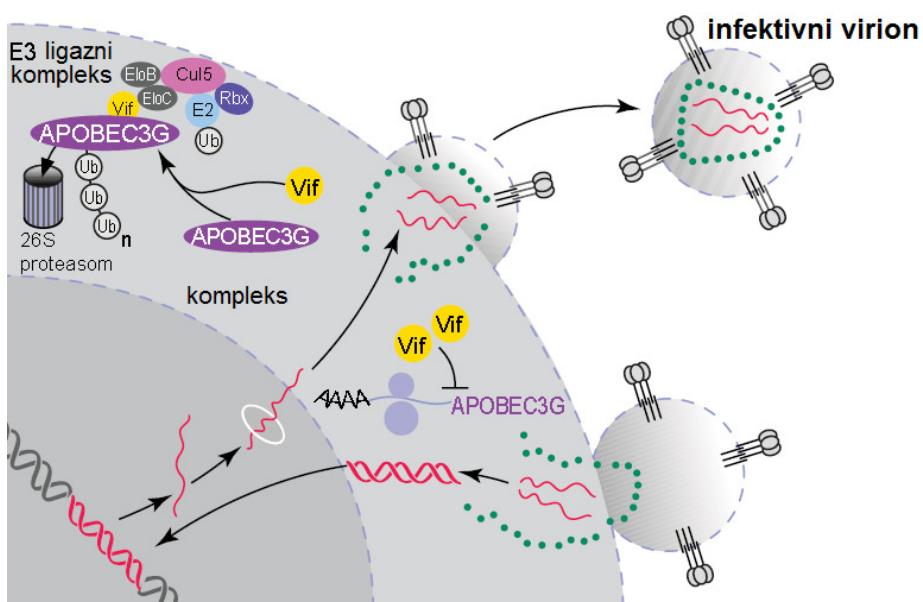
Ko se je število raziskav delovanja proteinov A3 povečevalo, se je kmalu pokazalo, da poleg hipermutacij nukleinskih kislin obstajajo še drugi mehanizmi inhibicije akumulacije produktov reverzne transkripcije pri replikaciji virusov [44]. Tako raziskovalci sklepajo na naslednje neencimske mehanizme: inhibicija iniciacije reverzne transkripcije, sprememba procesivnosti reverzne transkriptaze (RT) [45] in zmanjšanje kopiranja reverznih transkriptov, tj. cDNA v tarčnih celicah [46, 47]. Pomembno pa je poudariti, da so bili ti rezultati pridobljeni pri poskusih čezmerne ekspresije proteinov A3, do podobnih rezultatov pa ob fiziološki stopnji ekspresije še niso prišli. V poskusih je bilo pokazano, da poteče imunoprecipitacija človeškega A3G (hA3G) z virusno integrazo in nukleokapsido

[48], ne pa tudi z virusno RT [45]. To na nek način pojasnjuje, zakaj le čezmerna ekspresija inhibira virusno replikacijo.

Tekom evolucije pa so tudi virusi razvili določeno obrambo pred gostiteljevimi proteinimi A3. Pri virusu HIV je to protein Vif protein. Le-ta s pomočjo virusno specifičnega okvirja SLQ(Y/F)LA rekrutira elongina B in C in s pomočjo Zn²⁺ vezavnega HCCH motiva aktivira cullin5, ter tako tvori E3 ubikvitin ligazni kompleks, ki povzroči poliubikvitinizacijo proteina A3 (konkretno A3G in A3F) in posledično njegovo proteosomsko razgradnjo s 26S proteasomom [57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64]. Poleg teh razgradnihih učinkov pa je bil opažen tudi vpliv Vif-a na *de novo* sintezo A3G, natančneje, Vif delno ovira translacijo A3G [76] (slika 9).

Drugi raziskovalci so opazili še drug mehanizem delovanja. Pokazano je bilo, da prihaja do interakcije med N-terminalno regijo proteina Vif in N-terminalno regijo A3G [65, 66, 67, 68, 69]. Natančneje, aminokislina na mestu 128 proteina A3G je odgovorna za vrstno specifično inhibicijo delovanja A3G s strani Vif. Tako zamenjava Asp128 v hA3G z Lys128 vodi v nastanek Vif rezistentne oblike A3G proteina [70, 65, 71, 66]. Vif pa ne deluje vedno samostojno. V kombinaciji z še enim virusnim proteinom, imenovanim Vpr, lahko povzroči zatoj celičnega cikla in pomaga virusu HIV-1 pri T celičnih citopatskih efektih [119].

HIV wild-type infekcija



Slika 9: Nevratilizacija delovanja proteina A3 s strani proteina Vif [52: 292]. Vif rekrutira elemente E3 ligaznega kompleksa (Rbx1, cullin5, elongin B, elongin C, E2-Ub). S tem se inducira poliubikvitinacija in posledično proteasomska degradacija s 26S proteasomom. Zaznan je bil tudi zaviralni vpliv Vif-a na samo translacijo A3G proteina [52]..

Posamezni proteini A3 lahko inhibirajo tudi retroviruse iz drugih rodov. Tako sta hA3B in hA3C močna inhibitorja SIV, katerega gostitelj je vrsta *Macaca mulatta* (SIVmac) in SIV, katerega gostitelj je vrsta *Chlorocebus sabaeus* (SIVagm) [77], A3G pa vpliva na replikacijo konjskega infektivnega anemičnega virusa (EIAV) [44], mišjega levkemičnega virusa (MLV) [78, 79, 72, 125, 80, 81] in mišjega prsnega tumorskega virusa (MMTV) [82]. Novi dokazi kažejo tudi, da A3G in A3F motita replikativni cikel virusa hepatitis B (HBV), blokirata vključitev HBV RNA v subgenomske delce, destabilizirata virusni reverzno transkripcijski kompleks ter ovirata vključitev HBV DNA v virione [83, 84, 85, 86]. Deaminazno neodvisno aktivnost hA3G je moč opaziti tudi pri ciklu človeškega T-celičnega limfotropskega virusa tip I. Kot v primeru HIV se hA3G tudi tu vključi v HTLV-I, a učinek je v primerjavi s HIV zmeren [87, 88]. Zanimiva pa je ugotovitev, da lahko hA3A inhibira tudi replikacijo parvovirusa AAV, ki svoj življenjski cikel zaključi brez RNA intermediata ter reverzne transkripcije [102].

Pregleden prikaz protivirusnega delovanja proteinov A3 je prikazan v Tabeli 1.

Tabela 1: **Povzetek virusne inhibicije s proteini A3 [96: 121].** ✓ → pozitiven rezultat; X → negativen rezultat; (✓) → neodločen rezultat; — → ni podatka. Zadnji stolpec predstavlja rezultate z mutiranimi proteini, ki imajo točkovne mutacije v CDA aktivnem mestu [96].

Element	hA3 protein	Inhibicija z divjim tipom hA3	Encimska aktivnost	Inhibicija z mutiranim hA3
Eksogeni retrovirusi				
Divji tip HIV-1	hA3G	(✓)	✓	—
	hA3B	✓	✓	—
HIV-1 Δvif	hA3G	✓	✓	✓
	hA3F	✓	✓	✓
	hA3B	✓	✓	—
	hA3DE	(✓)	✓	—
HIV-2 Δvif	hA3G	✓	—	—
SIVmac Δvif	hA3G	✓	—	—
	hA3B	✓	—	—
	hA3C	✓	—	—
	hA3DE	(✓)	—	—
SIVagm Δvif	hA3G	✓	—	—
	hA3B	✓	✓	—
	hA3C	✓	✓	—
	hA3DE	(✓)	—	—
MLV	hA3G	✓	✓	—
EIAV	hA3G	✓	—	—
PFV	hA3G	✓	✓	—
	hA3F	✓	✓	—
Ostali virusi				
HBV	hA3G	✓	✓	X
	hA3F	✓	✓	—
	hA3B	✓	✓	—
AAV	hA3A	✓	—	X

2.3.2 Inhibicija retrotranspozicije

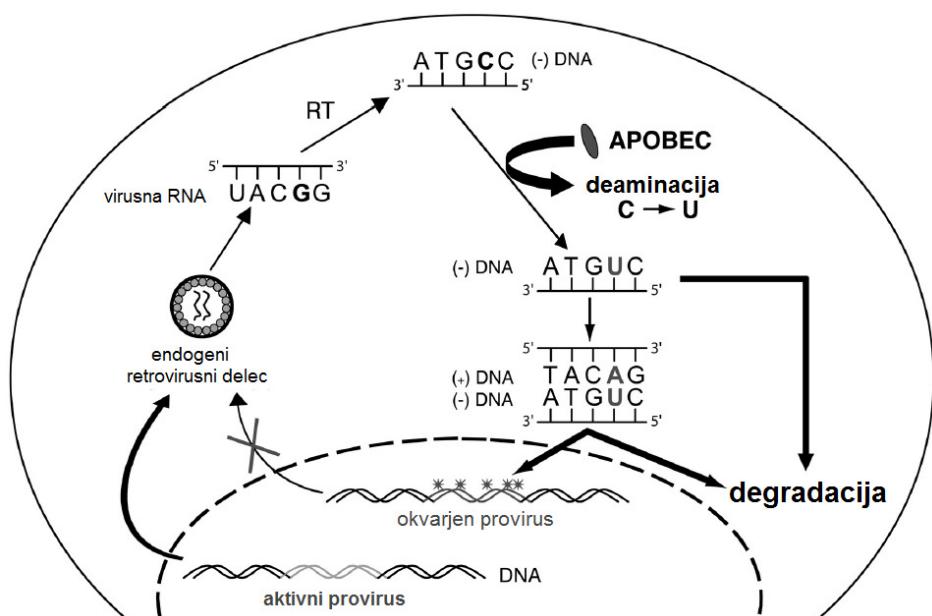
Proteini A3 inhibirajo retrotranspozicijo retrotranspozonov LTR in retropozonov [20, 102, 141]. Učinek posameznih proteinov A3 na nekatere najpogosteje retroelemente je prikazan v tabeli (tabela 2).

Tabela 2: **Povzetek inhibicije retrotranspozonov s proteini A3 [96: 121].** ✓ → pozitiven rezultat; ✗ → negativen rezultat; (✓) → neodločen rezultat; — → ni podatka. Zadnji stolpec predstavlja rezultate z mutiranimi proteini, ki imajo točkovne mutacije v CDA aktivnem mestu [96].

Element	hA3 protein	Inhibicija z divjim tipom hA3	Encimska aktivnost	Inhibicija z mutiranim hA3
Endogeni retroelementi				
Retrotranspozoni LTR				
IAP	hA3G	✓	✓	—
	hA3A	✓	✗	✓
	hA3B	✓	—	✓
	hA3C	✓	—	—
	hA3F	✓	—	—
MusD	hA3A	✓	✗	✗
	hA3B	✓	—	—
	hA3C	✓	—	—
	hA3F	✓	✓	—
	hA3G	✓	✓	—
Ty1	hA3G	✓	✓	(✓)
	hA3F	✓	✓	—
	hA3C	✓	—	—
Retropozoni				
LINE-1	hA3A	✓	✗	✗
	hA3F	✓	✗	—
	hA3B	✓	✗	✓
	hA3C	✓	✗	—
Alu	hA3A	✓	—	—
	hA3G	✓	—	✓
	hA3B	✓	—	—
	hA3C	(✓)	—	—

Inhibicija retrotranspozicije retrotranspozonov LTR poteka po enakem mehanizmu kot pri retrovirusih: preko deaminacije citidina v uridin. Posledica deaminacije je visoka raven mutacij G v A v kopijah retrotranspozonov LTR. Vendar obstaja še vsaj en drugačen mehanizem inhibicije. Na to kaže dejstvo, da mutacija aktivnega encimskega mesta v proteinu A3 ne izniči njegove sposobnosti inhibiranja retrotranspozicije. Najučinkovitejša inhibitorja sta A3A in A3B [20, 22]. Slika shematsko prikazuje mehanizem dvojne inhibicije proteinov A3 (slika 10).

Pri inhibiciji retropozonov so najučinkovitejši A3A, A3B, A3C in A3F, najmanj pa A3G in A3H. Znano je tudi, da se učinki različnih proteinov A3 seštevajo. V novonastalih kopijah LINE-1 sicer ni opaziti A → G hipermutacij, a ker mutacija aktivnega mesta kljub temu bolj ali manj zmanjša inhibicijo retrotranspozicije, se domneva, da se sicer hipermutirana cDNA bodisi sproti razgradi, bodisi ji je tako ali drugače preprečena integracija v genom [22, 101, 155].



Slika 10: **Model dvojnega učinka aktivnosti proteinov APOBEC na retrotranspozicijo** [22: 1529]. Aktivni endogeni provirusi – npr. MusD – proizvajajo retrovirusne delce, katerih RNA se reverzno prepisuje v enoverižno cDNA, ki pa je občutljiva na deoksicitidinsko deaminazno aktivnost s strani proteinov APOBEC. Takšna DNA (eno- ali dvoverižna), ki vsebuje uridinske ostanke, se v končni fazi degradira s pomočjo celičnih UNG ("prva linija obrambe"). Provirusne kopije, ki pa se tako ali drugače izognejo razpadu in se jim uspe integrirati v genom gostiteljske celice, pa nosijo A → G hipermutacije na (+)DNA verigi, zaradi katerih niso sposobne retrotranspozicijskih ciklov ("druga linija obrambe") [22].

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

APS (10% raztopina)

- ➔ 10 g APS v prahu
- ➔ dopolnimo z dH₂O do 100 mL

Etanol (70%)

- ➔ 72,917 mL 96% etanola
- ➔ dopolnimo z dH₂O do 100 mL

Geneticin

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

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

3.1.2 Kemikalije

Agaroza	Serva, Nemčija
Akrilamid / bisakrilamid (30% / 0,8% raztopina)	Fluka, Švica
APS v prahu	Serva, Nemčija
BSA (10 mg/mL)	New England BioLabs, VB
DMEM GlutaMax™-I	Gibco, Invitrogen, ZDA
DPBS (1x koncentrat)	Gibco, Invitrogen, ZDA
Etanol (96%)	Carlo Erba, Italija
FBS (EU Approved Origin)	Gibco, Invitrogen, ZDA
Fiksir za rentgenske filme	Kodak, ZDA
Fugene6® transfekcijski reagent	Roche, Švica
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder MBI	Fermentas, Litva
Geneticin®	Gibco, Invitrogen, ZDA
Glicin	Serva, Nemčija
Ligazni pufer (2x koncentrat)	New England BioLabs, VB
BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Roche, Švica

Metanol	Merck, Nemčija
Nanašalni pufer za agarozno elektroforezo (6-kraten)	MBI Fermentas, Litva
Natrijev dodecilsulfat	Serva, Nemčija
NEB2 pufer za restriktazi (10x koncentrat)	MBI Fermentas, Litva
Optimem® (1x koncentrat)	Gibco, Invitrogen, ZDA
PBS tablete	Sigma, ZDA
Posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Slovenija
Proteazni inhibitor	Sigma, ZDA
Raztopina penicilina in streptomicina	Sigma, ZDA
Razvijalec za rentgenske filme	Kodak, ZDA
SeeBlue® Plus2 Prestained Standard; 1-kraten	Invitrogen, ZDA
SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain	Invitrogen, ZDA
T4 ligazni pufer (10x koncentrat)	New England BioLabs, VB
TEMED	Merck, Nemčija
Tripsin/EDTA (0,05% raztopina)	Gibco, Invitrogen, ZDA
Tris	Serva, Nemčija
Tween® 20	Fluka, Švica

3.1.3 Raztopine in geli

Agarozni gel (1% raztopina)

- ➔ 0,8 g agaroze
- ➔ 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

NaDS pufer (1x koncentrat)

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

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

- ➔ 30,2 g Tris baze
- ➔ 144 g glicina
- ➔ 10 g NaDS
- ➔ dopolnimo 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 : 10 000)

- ➔ 4 µL sekundarnih protiteles
 - ➔ 20 mL blokirne raztopine
-

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
 - ⇒ dopolnimo z dH₂O do 1 L
 - ⇒ s HCl uravnamo pH do 7,6 - 7,8

TAE pufer (1x koncentrat)

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

3.1.4 Topila

Deionizirana voda

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

3.1.5 Encimi

Restriktijske endonukleaze (20,000 U/mL)

- | | |
|--------------------------|-------------------------|
| ➔ <i>HindIII, XhoI</i> | New England BioLabs, VB |
| T4 ligaza (400,000 U/mL) | New England BioLabs, VB |

3.1.6 Protitelesa

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

3.1.7 Kompleti (kits)

QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Nemčija
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN, Nemčija
Platinum® Pfx DNA Polymerase Kit	Invitrogen, ZDA
QuikChange® II-E Site-Directed Mutagenesis Kit	STRATAGENE, ZDA

3.1.8 Oligonukleotidi

A3A E72A/s STRATAGENE, ZDA

→ 5'-GGC CGC CAT GCG GCG CTG CGC TTC TTG-3'

A3A E72A/as STRATAGENE, ZDA

→ 5'-CAA GAA GCG CAG CGC CGC ATG GCG GCC-3'

A3B E68Q/s STRATAGENE, ZDA

→ 5'-AAG CCT CAG TAC CAC GCA CAA ATG TGC TTC CTC-3'

A3B E68Q/as STRATAGENE, ZDA

→ 5'-GAG GAA GCA CAT TTG TGC GTG GTA CTG AGG CTT-3'

C-A3B *Xho*I/as MWG, Nemčija

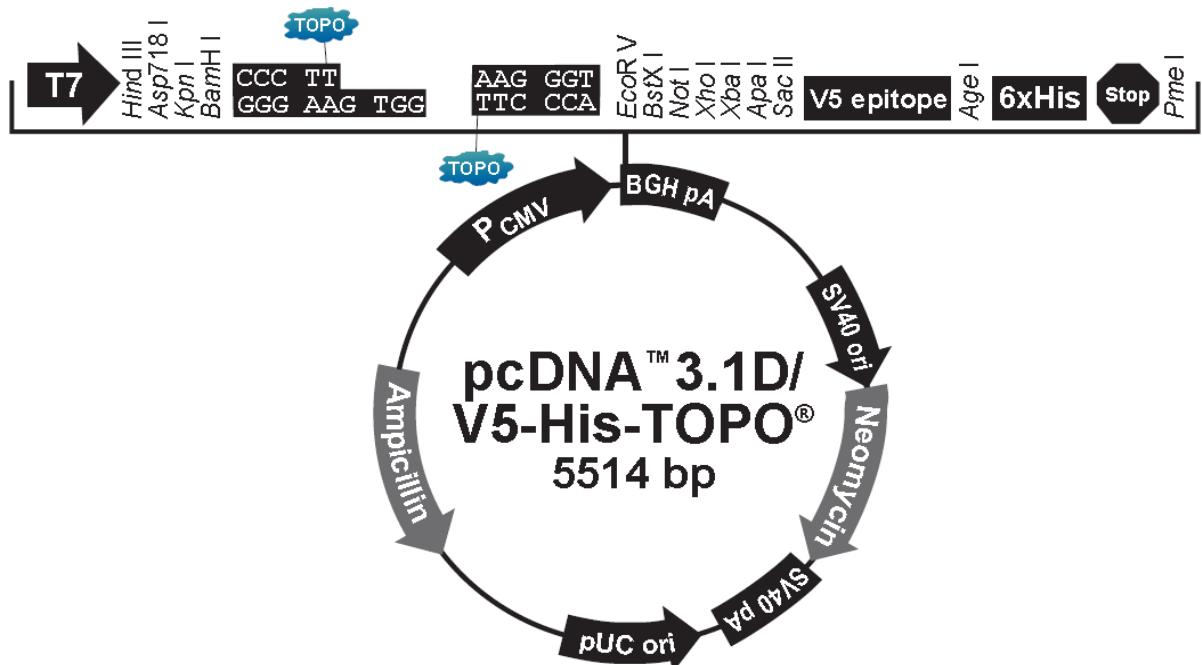
→ 5'-TCG AGC GTT TCC CTG ATT CTG GAG AAT-3'

N-A3B *Hind*III/s MWG, Nemčija

→ 5'-GAA AGC TTA TGA ATC CAC AGA TCA GAA AT-3'

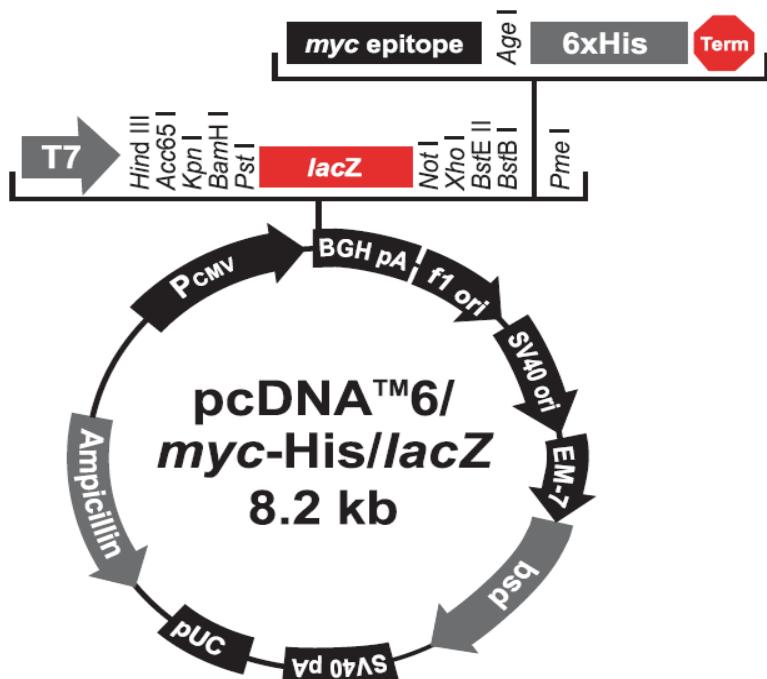
3.1.9 Plazmidi in celice

→ Plazmid pcDNA™ 3.1D/V5-His-TOPO® Invitrogen, ZDA



Slika 11: Shematski prikaz vektorja pcDNA™3.1D/V5-His-TOPO®.

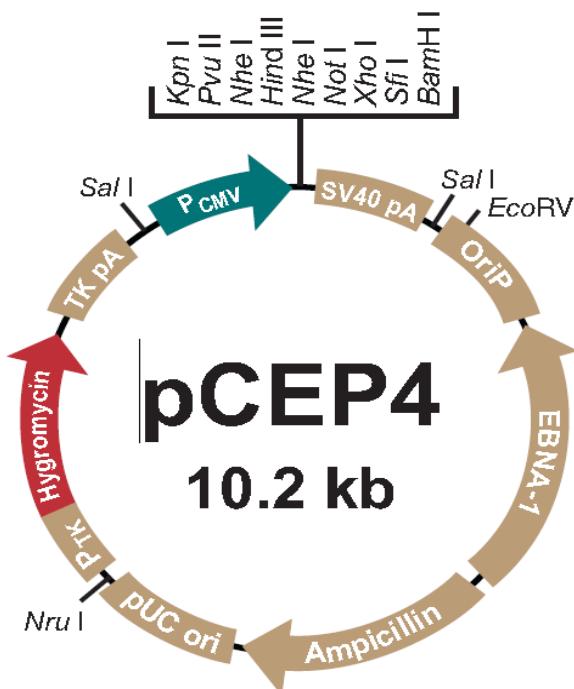
→ Plazmid pcDNA6/myc-His/lacZ® Invitrogen, ZDA



Slika 12a: Shematski prikaz vektorja pcDNA6/myc-His/lacZ®.

➔ Plazmida JM101 [162] in BZ-25 [146]

⇒ v pCEP4 (Invitrogen, ZDA) vstavljenha sekvenca LINE-1 skupaj z *mneol* detekcijsko kaseto (JM101) oz. vstavljenha sekvenca ZfL2 prav tako z *mneol* (BZ-25)



Slika 12b: Shematski prikaz vektorja pCEP4.

➔ Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ kompetentne celice

Invitrogen, ZDA

⇒ celice *E. coli*, sev DH α

⇒ genotip: F⁻ Φ 80lacZΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ*

➔ HEK 293T celice

⇒ Sesalske celice 293T imajo veliki T-antigen virusa SV40, 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. Tako se sintetizira velika količina proteina.

➔ HeLa celice

⇒ HeLa celice so v znanstvenem raziskovanju najpogosteje uporabljena nesmrtna celična linija. Izvirajo iz tumorja materničnega vratu Henriette Lacks, ki je 4. oktobra 1951 za njegovimi posledicami tudi umrla. Najprej so bile v uporabi pri raziskavah raka, kasneje pa so se izkazale kot primerne tudi na drugih področjih, npr. za ekspresijo plazmidnih vektorjev. Njihova stopnja proliferacije je izjemno velika, tudi v primerjavi z ostalimi rakavimi celicami, to pa zaradi vseskozi prisotne aktivne oblike encima telomeraza. Ta encim preprečuje prirastno krajšanje telomer, ki je močan faktor staranja in posledične smrti celice.

Leigh Van Valen je na celice HeLa gledal s posebnega vidika. Uvrstil jih je v svojo biološko vrsto, *Helacyton gartleri*, in sicer na osnovi treh argumentov:

- kromosomska inkompaktibilnost s človeškimi celicami (HeLa jih imajo namreč 82);
- svojstvena ekološka niša;
- zmožnost obstoja in razširjanja daleč preko zahtev človeških kultivatorjev.

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
Nitrocelulozna membrana	Serva, Nemčija
Spektrofotometer Nanodrop ND-1000	NanoDrop Technologies, ZDA
Stresalnik Mighty Slim SX 250 power supply	Hoefer, ZDA
Termoblok Biometra Ts1 ThermoShaker	Biometra, Nemčija

UV transiluminator	Visi-Blue™ Transilluminator (VB)
Vibracijski mešalnik	Bioblock Scientific, Francija
Vlažni inkubator MCO-18AIC	Sanyo Electric Co, Japonska

3.2 METODE

3.2.1 Delo z DNA in bakterijami

3.2.1.1 Restrikcija

Restrikcija je rezanje DNA z restriktionskimi endonukleazami oziroma restriktazami. Restriktaze so encimi, ki prepoznajo in cepijo točno določeno nukleotidno zaporedje, običajno dolgo 4-8 nukleotidov [157].

Uporabili smo jo za pripravo inserta za ligacijo in za preverjanje uspešnosti ligacije. Restriktionski zmesi smo dodali plazmidno DNA, restriktionska encima *HindIII* in *XhoI* (20,000 U/mL, New England BioLabs) v končnem deležu 5% - 10% v/v, 10x pufer NEB2 (MBI Fermentas) v končnem deležu 10% v/v, 100x goveji serumski albumin (BSA, 10 mg/mL, New England BioLabs) v končnem deležu 1% v/v in deionizirano vodo do končnega volumna. Na voljo smo imeli 4 pufre NEB, ustrezne pa smo izbrali v odvisnosti od uporabljenih restriktaz, tj. izbrali smo tistega, pri katerem imata uporabljeni restriktazi čimvečjo, po možnosti 100% učinkovitost. V našem primeru je bil to pufer NEB2, v katerem imata oba encima 100% učinkovitost. Restrikcija je potekala 2 uri pri 37 °C.

3.2.1.2 Agarozna elektroforeza

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 najdlje od mesta nanosa, in obratno. 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 eno najbolj občutljivih fluorescenčnih barvil za detekcijo eno- ali dvojerižnih DNA ali RNA v elektroforetskih gelih. Sybr Safe smo v razmerju 1 µL na 10 mL gela dodali agaroznemu gelu. Pred nanosom na gel smo vzorcem dodali 6x nanašalni pufer (MBI Fermentas) v končnem deležu 16,7% v/v. Elektroforeza je potekala v 1x TAE pufru pri gostoti napetosti 9 V/cm in električnem toku 90 mA. Po končani elektroforezi smo gel presvetlili z UV svetlogo in ga fotografirali.

3.2.1.3 Izolacija DNA iz agarognega gela

Če smo agarozno elektroforezo uporabili kot preparativno metodo, smo po njenem zaključku nad UV svetlogo iz gela izrezali fragmente DNA ustrezne velikosti. Za izolacijo fragmenta DNA iz gela smo uporabili QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Nemčija) 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, razrezen z ustreznima restriktazama, ter insert z zapisom za protein A3B, ki smo ga pripravili s PCR z uporabo ustreznih oligonukleotidov. Izraz "ustrezni" restriktazi in "ustrezna" oligonukleotida pomeni, da izberemo takšno kombinacijo restriktaz in oligonukleotidov, da se ustvarijo pravilno orientirani lepljivi konci.

Ligacijska zmes je vsebovala vektor pcDNA6, insert (zapis za protein A3), T4 ligazo (400,000 U/mL, New England BioLabs) v končnem deležu 10%, T4 10x ligazni pufer (New England BioLabs) v končnem deležu 10% in deionizirano vodo do končnega volumna. Za ligacijo smo uporabili 50 ng vektorja in trikratno množino inserta. Maso inserta smo izračunali po enačbi: $m(\text{insert}) = [3 \times m(\text{vektor}) \times l(\text{insert})] / L(\text{vektor})$. Ligacija je potekala 24 do 48 ur pri 16 °C.

3.2.1.5 Transformacija

Transformacija je vnos tuge DNA v bakterijske celice z namenom pomnožitve tuge DNA. V eksperimentu smo uporabili komplet Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ kompetentne bakterijske celice *E. coli* (Invitrogen). Na ledu odtaljenim celicam (50 µL) smo dodali 1 - 5 µL plazmidne raztopine, če smo samo množili plazmide, pri transformaciji ligacije pa smo dodali celotno ligacijsko mešanico, saj je poleg že tako nizke verjetnosti sprejetja plazmida v celico tudi verjetnost uspeha ligacije relativno majhna. Poleg zaželjene povezave inserta in vektorja je namreč možna tudi povezava več vektorjev med sabo. Nato smo transformacijsko zmes inkubirali 30 minut na ledu. Po inkubaciji je sledil temperaturni šok pri 42 °C za 20 sekund in ponovna ohladitev na ledu za 2 minuti. Zmesi smo dodali tekoče gojišče LB in inkubirali 40 minut pri 37 °C in 220 - 240 obratih/min. Dalje smo v primeru razmnoževanja obstoječih plazmidov na trdno gojišče LB z antibiotikom ampicilinom (LBA), zagretega na 37 °C, enakomerno nanesli 50 µL transformacijske mešanice, če pa smo transformirali ligacijsko mešanico, pa smo po površini plošče razmazali celotno zmes. Gojišča s celicami smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.2.1.6 Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih celic ("minipreparacija")

Transformaciji je sledilo pomnoževanje celic, ki so pri transformaciji sprejele plazmid ter izolacija tako namnoženih plazmidov. Če smo predhodno transformirali obstoječe plazmide, smo posamezno kolonijo s plošče prenesli v 20 ml tekočega gojišča LBA, če pa smo izvedli transformacijo ligacije, smo vsaj 5 različnih kolonij prenesli vsako v 2 ml tekočega LBA medija. Tekočo kulturo smo s stresanjem inkubirali na 37 °C in 220 - 240 obratov/min čez noč. Sledila je izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih celic. Uporabili smo komplet QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Nemčija) ter postopek izvedli po navodilih proizvajalca. Izolacija plazmidov iz bakterijskih celic je temeljila na razbitju celic, sledila je vezava plazmidne DNA na membrano ter na koncu eluacija vezane DNA z vodo (slika 13).



Po končani izolaciji namnoževanja obstoječih plazmidov smo ugotovili koncentracijo izolirane plazmidne DNA (3.2.1.7), vzorce označili in spravili na -20 °C. Izolirano plazmidno DNA, ki pa je bila produkt ligacije, smo dalje analizirali z restrikcijo (3.2.1.1) in agarozno elektroforezo (3.2.1.2). Tako smo preverili, če vzorci vsebujejo odseke DNA pričakovane velikosti (insert in vektor). Prisotnost dveh lis na gelu pomeni, da sta se vektor in insert pri ligaciji uspešno združila. V primeru, da plazmid ne bi sprejel inserta, bi na gelu ostala le lisa, ki bi pripadala praznemu plazmidu. Ustrezne vzorce plazmidov smo poslali podjetju MWG BIOTECH v Ebersbergu v Nemčiji, kjer so ugotovili zaporedje plazmidne DNA.

Slika 13: 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 [158].

3.2.1.7 Spektrofotometrično ugotavljanje koncentracije plazmidne DNA

Uporabljali smo spektrofotometer priključen na računalnik, kot programska oprema pa nam je služil program proizvajalca spektrofotometra, ND-1000. Aparat najprej umerimo, tj. kot referenčno vrednost mu postavimo absorbcojo samega topila (v našem primeru je bila to destilirana voda). Nato ugotovimo koncentracijo vzorcev po navodilih proizvajalca

računalniškega programa, pri čemer nam program poda koncentracijo v nanogramih na mikroliter.

3.2.1.8 Točkovna mutageneza

V poskusu smo med drugim ugotavljali vpliv mutiranih A3A in A3B proteinov na stopnjo retrotranspozicije. Za pripravo mutant smo uporabili komplet QuikChange® II-E Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, ZDA). Najprej smo naročili primerje (MWG, Nemčija) z željeno mutacijo, pri čemer smo upoštevali priporočila proizvajalca kompleta:

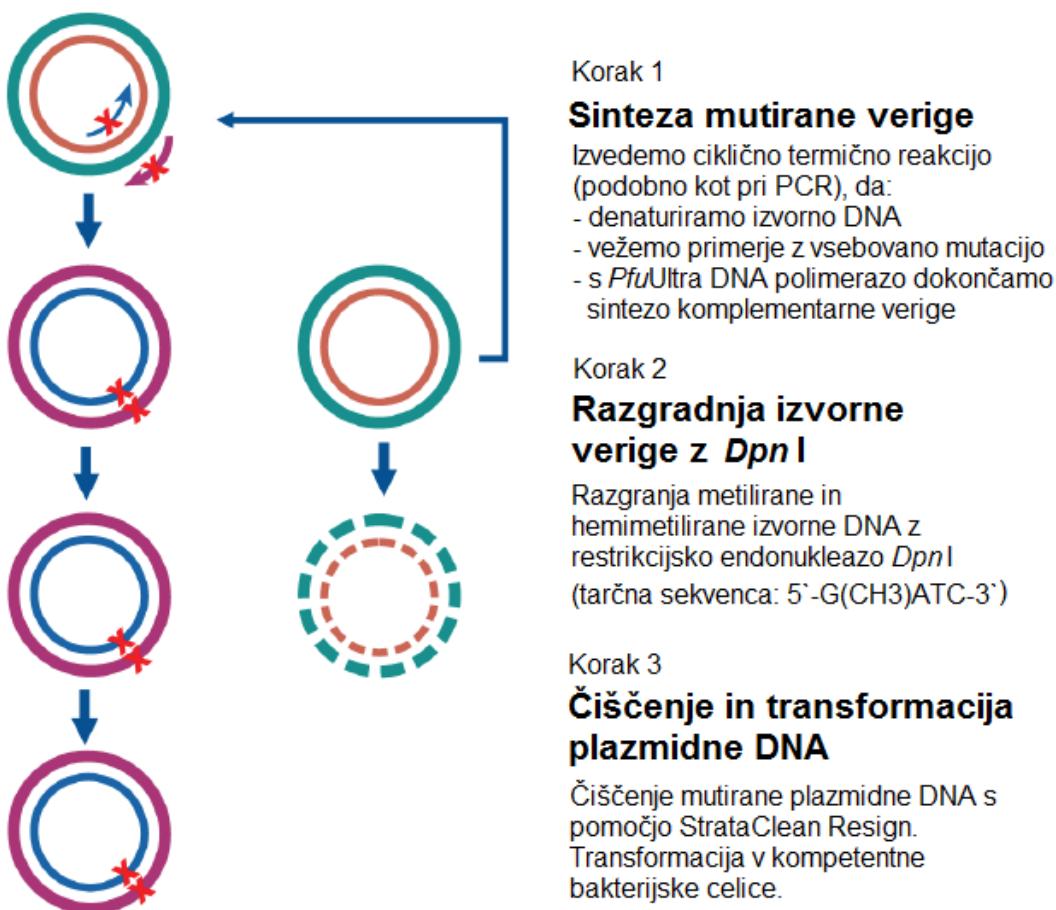
- ⇒ oba mutagena primerja morata vsebovati konkretno mutacijo in se vezati na enako zaporedje na nasprotnih verigah;
- ⇒ primerja naj bosta dolga med 25 in 45 bp s temperaturo tališča (Tm) višjo ali enako 78 °C;
- ⇒ za določanje Tm uporabimo naslednjo formulo:
$$Tm = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ miss},$$
 kjer N predstavlja dolžino primerja v bazah, % miss pa delež baz v primerju, ki se ne bodo prilegala plazmidni DNA;
- ⇒ primer naj željeno mutacijo vsebuje približno na sredini oz. naj ima na vsakem koncu vsaj 10 – 15 baz pravilne sekvene;
- ⇒ za optimalno izvedbo mutageneze naj primer vsebuje najmanj 40% GC parov, konča pa se naj z eno ali večimi C ali G bazami.

V reakcijsko zmes smo zmešali 5 µL 10x reakcijskega pufra, 50 ng plazmidne DNA, po 125 ng vsakega od obeh oligonukleotidnih primerjev, 1 µL dNTP mešanice in destilirano vodo do končnega volumena 50 µL. Čisto na koncu smo dodali še 1 µL DNA polimeraze *PfuUltra HF* (2,5 U/µL). Vzorce smo namestili v in nastavili naslednje parametre ciklične reakcije:

95 °C	1 min	
95 °C	30 s	
55 °C	1 min	
68 °C	10 min	
68 °C	5 min	

18 ciklov

Nadaljni postopek smo izvedli po priporočilih proizvajalca z izjemo načina transformacije. Namesto elektroporacije XL1-Blue kompetentnih celic smo opravili temperaturno transformacijo z uporabo kompleta Subcloning Efficiency™ DH5α™ kompetentnih celic *E. coli* (3.2.1.5). Posplošen postopek mutageneze je prikazan na sliki 14.



Slika 14: Shematski prikaz točkovne mutageneze z uporabo kompleta QuikChange II-E site-directed mutagenesis kit. Tristopenjski proces mutageneze: sinteza mutirane verige, razgradnja izvorne DNA in čiščenje ter transformacija plazmidne DNA. Na koncu izvedemo še običajno "minipreparacijo" (3.2.1.6). Pri tem postopku mutageneze je pomembno, da je izvorna plazmidna DNA izolirana iz dam⁺ *E. coli* sevov. Plazmidna DNA iz dam⁻ sevov, kot sta JM110 in SCS110, ni primerna, ker ni metilirana [160].

3.2.1.9 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin. Z njo lahko pomnožimo tarčni odsek DNA, katerega opredelimo s primerjema. 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 [157]. Zelo pomembno je paziti na sterilnost, saj onesnaženje že z najmanjšim delčkom nukleinske kisline najverjetneje pokvari eksperiment.

Reakcijska zmes je vsebovala 2 µL plazmidne DNA s tarčnim insertom, po 2 µL vsakega izmed dveh primerjev, 0.5 µL 50 mM MgSO₄, 2 µL 10mM dNTP, 2.5 µL 10x pufra, 1 µL pripravka *Pfx* polimeraze in 11 µL deionizirane vode. Poleg vzorcev smo pripravili še negativno kontrolo, kjer smo DNA nadomestili z deionizirano vodo.

Uporabili smo naslednji program za reakcijo:

94 °C	2 min
94 °C	15 s
55 °C	30 s
68 °C	1 min
4 °C	∞

25 ciklov

Produkt PCR smo analizirali z agarozno elektroforezo (3.2.1.2), ustrezni fragment izrezali iz gela (3.2.1.2) ter ga ligirali (3.2.1.4) v vektor, predhodno razcepljen z ustreznimi restriktazami (3.2.1.1).

3.2.2 Delo s sesalskimi celicami

3.2.2.1 Odmrzovanje in zamrzovanje celic

Zamrznjene celice smo hranili v posodi s tekočim dušikom. Vialko s celicami smo takoj prenesli v vodno kopel, ogreto na 37 °C, kjer smo jo rahlo stressali, dokler se celotna

vsebina ni popolnoma odmrznila. Odmrzovanje se mora vedno zgoditi v najkrajšem možnem času, s čimer se prepreči tvorba ledenih kristalov, ki bi lahko povzročili lizo celic. Preden smo vialko odprli, smo jo dobro očistili s 70 odstotnim etanolom. Dalje smo celično suspenzijo prenesli v sterilno centrifugirko, vsebujoč 2 ml na 37 °C zagretega kompletnega gojišča (komercialnemu gojišču DMEM GlutaMax™-I dodan FBS do končne koncentracije 10% (v/v) ter raztopina penicilin/streptomicin (P/S, Invitrogen) do končne koncentracije 1% (v/v)). Nato smo centrifugirali 10 min pri 150 – 200 × g pri sobni temperaturi. Supernatant smo zavrgli, celice pa sprali s svežim kompletnim gojiščem, da smo odstranili preostali DMSO. Nadaljevali smo z nežnim resuspendiranjem v majhnem volumnu (~ 1 ml) kompletnega medija. Nastalo celično suspenzijo smo prenesli na polistirenske plošče premera 10 cm, v katerih je že bilo ~ 9 ml kompletnega medija [156].

Gojene celice lahko zamrznemo z namenom shranjevanja, v izogib staranja, zmanjšanja verjetnosti kontaminacije ter minimiziranja efektov genetskega drsa. Nujno moramo uporabiti krioprotektivno sredstvo, saj je v nasprotnem primeru zamrzovanje za celice letalno. Najprej smo prekinili vezavo celic na dno plošče: celice smo prekrili z 0,05% raztopino tripsin/EDTA (Invitrogen), jih dali za 3 min v inkubator, dodali 5 ml kompletnega medija ter celice resuspendirali. S hemacitometrom smo prešteli celice, prenesli suspenzijo v "falkonko" in centrifugirali 5 min pri 1400 obratih/minuto in sobni temperaturi. Iz falkonke smo odstranili supernatant, dodali 1 ml na 4 °C ohlajenega zamrzovalnega gojišča (20% DMSO, 80% FBS) in resuspendirali. Suspenzijo smo dalje ustrezno redčili, da smo dobili končno koncentracijo 10^6 – 10^7 celic/ml. To suspenzijo smo nato prenesli v 2 ml kriovialke, in sicer po 1 ml v vsako. Le-te smo nazadnje za 1 uro do preko noči postavili na -80 °C, po tem času pa v posodo s tekočim dušikom (~ -196 °C) [156].

3.2.2.2 Gojenje sesalskih celic

Pri delu smo uporabljali celični kulturi HEK 293T in HeLa. Celice smo gojili v kompletnem mediju 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 ozioroma precepitvi celic smo opazili po spremembi barve gojišča iz

rdeče v oranžno, saj je ta spremenil pH. Običajno smo gojišče zamenjali s svežim vsakih 48 – 72 ur [156].

3.2.2.3 Vzdrževanje nesmrtnih celičnih linij s precepljanjem

Če so celice v kulturi preveč namnožene, bo prišlo do odmiranja celic, če pa precepitev izvedemo prezgodaj, bo potrebno več časa, da bodo zrasle do ustrezne gostote. Celice smo precepili, ko so dosegle približno 85 - 95% konfluenco. Gojišče smo odsesali in celice sprali s majhnim volumnom 1x fosfatnega pufra (DPBS, Invitrogen). V nadaljevanju smo dodali 1 mL 0,05% raztopine trypsin/EDTA (Invitrogen). Sledila je inkubacija za 3 minute na 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 na polistirensko ploščo premera 10 cm. Vsako ploščo smo dopolnili z gojiščem do končnega volumna 10 mL (redčenje 1:10).

3.2.2.4 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® Transfection reagent (Roche). Reagent tvori kompleks z DNA in jo tako prenese v sesalske celice. Transfekcijo smo izvajali iz dveh razlogov, in sicer ko smo preučevali ekspresijo proteinov A3 v 293T celih in ko smo opazovali vpliv proteinov A3 na retrotranspozicijo elementov LINE-1 in ZfL2.

Kompleks med transfekcijskim reagentom in DNA smo pripravili v gojišču Optimem® (Gibco), ki ne vsebuje seruma. 100 µL medija Optimem® smo dodali 3 µl transfekcijskega reagenta Fugene6® za vsak µg plazmida. Raztopino smo 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Nato smo ji dodali 1 µg posamezne plazmidne DNA (preračunan volumen glede na koncentracijo plazmidne DNA). Kot plazmidno DNA smo uporabili plazmid pcDNA6/ΔlacZ ali pcDNA6/APOBEC. Raztopino Optimem® medija, Fugene6® reagenta in rekombinantnih plazmidov smo inkubirali pol ure minut na sobni temperaturi. Kompleks

smo nato po kapljicah dodali v luknje "6-well plošče", v katerih je v vsaki bilo 3×10^5 celic v gojišču. Učinkovitost transfekcije smo preverili preko transfekcije plazmida, z zapisom za zeleni fluorescenčni protein (GFP). Tako smo 2 dni po transfekciji pod fluorescenčnim mikroskopom opazovali stopnjo fluorescence in približno ocenili učinkovitost transfekcije.

3.2.2.5 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 čim manj časa izpostavljeni sobni temperaturi, saj pri slednji bolje delujejo proteaze, ki bi lahko proteine razgradile. Celice smo nato prenesli v mikrocentrifugirko in centrifugirali 5 minut pri 1500 obratih/min. Supernatant smo zavrgli, usedle celice pa resuspendirali v 200 μL lizirnega pufrja RIPA z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI, SIGMA, 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ RIPA pufra). Liza je potekala 20 – 30 minut na ledu z vmesnim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Tako dobljeni lizat smo centrifugirali 5 minut pri 14 000 obratih/min, zavrgli usedlino, supernatant pa uporabili za analizo proteinov s prenosom po Westernu.

3.2.2.6 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 s čimer jim da negativni naboj [157]. 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. 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 TEMED polimerizira. TEMED pospeši kemijsko reakcijo amonijevega persulfata v amonijev radikal, ki nato povzroči polimerizacijo akrilamida in bisakrilamida.

Za pripravo koncentracijskega gela smo uporabili 2,5 ml pufra 4x Tris-Cl/SDS s pH 6,8, 6,1 ml deionizirane vode, 1,3 ml raztopine 30% akrilamid/0,8% bisakrilamid (Fluka), 50 µl 10% amonijevega persulfata (APS) in 15 µl tetrametiletilendiamina (TEMED, Merck). Običajno smo pripravili 10% separacijski gel. Tako smo zmešali 3,75 ml pufra 4x Tris-Cl/SDS s pH 8,8, 6,25 ml deionizirane vode, 5 ml raztopine 30% akrilamid/0,8% bisakrilamid (Fluka), 50 µl 10% amonijevega persulfata (APS) in 15 µl tetrametiletilendiamina (TEMED, Merck). Če pa smo pripravili 15 odstotni gel, smo za razliko od 10 odstotnega dali 2,5 ml več raztopine 30% akrilamid/0,8% bisakrilamid (Fluka) ter 2,5 ml manj deionizirane vode. Vzorce za nanos na gel smo pripravili tako, da smo lizatom dodali 6x nanašalni pufer za NaDS-PAGE (običajno je mešanica za nanos vsebovala 30 µL lizata in 6 µL nanašalnega pufra) ter jih inkubirali 5 minut v vreli vodi, s čimer smo dosegli popolno denaturacijo proteinov, tudi porušenje morebitne kvartarne strukture. Za prekinitev disulfidnih vezi proteinov v vzorcu pa 6x nanašalni pufer za NaDS-PAGE vsebuje reducent ditiotreitol (DTT). 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.

3.2.2.7 Prenos po Westernu (WB, eng. Western Blot)

Prenos po Westernu se lahko uporablja za detekcijo proteinov. Proteine iz poliakrilamidne gelske elektroforeze smo prenesli na nitrocelulozno membrano s pomočjo električnega toka. Prenos je potekal dve uri v pufru za prenos pri 200 mA in 250 V. Membrano smo nato spirali 3-krat po 5 min v pufru PBS, da smo odstranili prisoten metanol, nato pa smo jo 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 nespecifično na membrano [157].

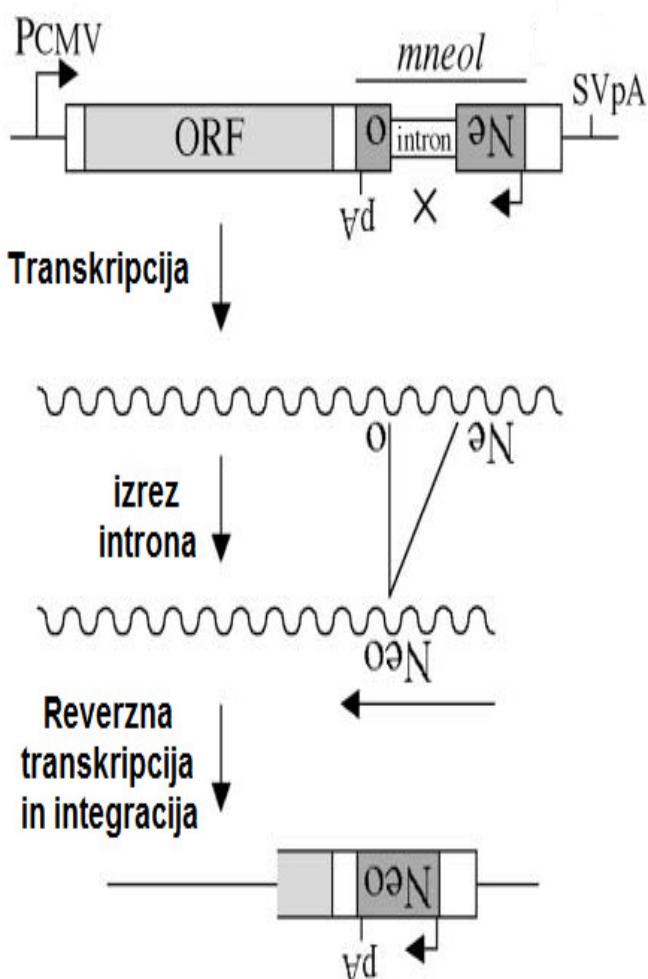
Po inkubaciji v blokirni raztopini smo izvedli specifično vezavo primarnih protiteles na proteine. Membrano, na katero smo prenesli proteine A1, mA3, A3C, A3F in A3G, smo inkubirali s primarnimi mišjimi monoklonskimi protitelesi proti *myc*-repu (anti-*myc* protitelesa, Invitrogen), membrano s proteini A3A, A3B, N-A3B, Mut-A3A in Mut-A3B

pa s primarnimi mišjimi monoklonskimi protitelesi proti *HA*-repu (anti-*HA* protitelesa, Sigma). Protitelesa prepoznajo *myc*-rep ali *HA*-rep proteina kot antigen in se nanj specifično vežejo. Raztopini primarnih protiteles sta bili v razmerju 1 : 2000, inkubacija pa 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 (HRP, Dianova). Raztopina sekundarnih protiteles je bila v razmerju 1 : 10 000, inkubacija pa je potekala 1 - 2 uri z rahlim stresanjem. Sekundarna protitelesa prepoznajo konstantno regijo mišjih protiteles kot antigen in se nanje specifično vežejo. Nazadnje smo membrano sprali 2-krat po 5 minut z raztopino PBST in 1x po 5 minut z 1x DPBS (Invitrogen). Membrani smo nakapali z raztopino BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) kemiluminiscenčnih substratov A in B (Roche, Švica) v razmerju A : B = 100 : 1 in pustili učinkovati 1 – 2 minuti. Ko dodamo kemoluminiscenčno raztopino, se pod vplivom encima peroksidaza sproži kemoluminiscenca, katere fotoni na fotografiskem filmu povzročijo potemnitve. V temnici smo na membrano položili film ter oboje vstavili v kaseto ter po 1 - 5 minutni ekspoziciji razvili film. Glede na kvaliteto in jakost signala na prvem razvitem filmu smo dalje vstavili še poljubno število filmov, katerim smo tudi po lastni presoji določali čas ekspozicije.

3.2.2.8 Ugotavljanje najmanjše učinkovite koncentracije geneticina

Ker preverjanje hitrosti retrotranspozicije temelji na pojavu celičnih kolonij, rezistentnih proti antibiotiku, smo ugotovili najnižjo koncentracijo antibiotika, ki še ubije celice HeLa. Ugotovili smo jo tako, da smo celicam HeLa v "6-well ploščah" dodali različno količino antibiotika geneticina (Geneticin® Liquid G-418 Sulfate, 50 mg/ml, Gibco). Končne koncentracije antibiotika v posamezni vdolbinici so bile: 0, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 in 1500 µg/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 [156]. Za selekcijo celic HeLa z geneticinom smo v nadaljevanju uporabili najnižjo koncentracijo antibiotika, pri kateri so vse celice umrle, tj. 500 µg/mL.

3.2.2.9 Ugotavljanje stopnje retrotranspozicije



Za določanje hitrosti retrotranspozicije smo uporabili retrotranspozona LINE-1 in ZfL2, označena z kaseto *mneol*. Kaseta *mneol* je na 3'-koncu retrotranspozona in kodira gen za neomicinsko rezistenco (gen *neo*) v protismiseln smeri, ki je prekinjen z intronom za človeški γ -globin v smiseln 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 genomske

Slika 15: **Shematski prikaz principa določanje hitrosti retrotranspozicije.** PCMV: citomegalovirusni promotor, Neo: gen za neomicinsko rezistenco, SVpA: SV40 poliadensilacijski signal, ORF: odprtji bralni okvir. Retrotranspozon ima vstavljenko 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 [147].

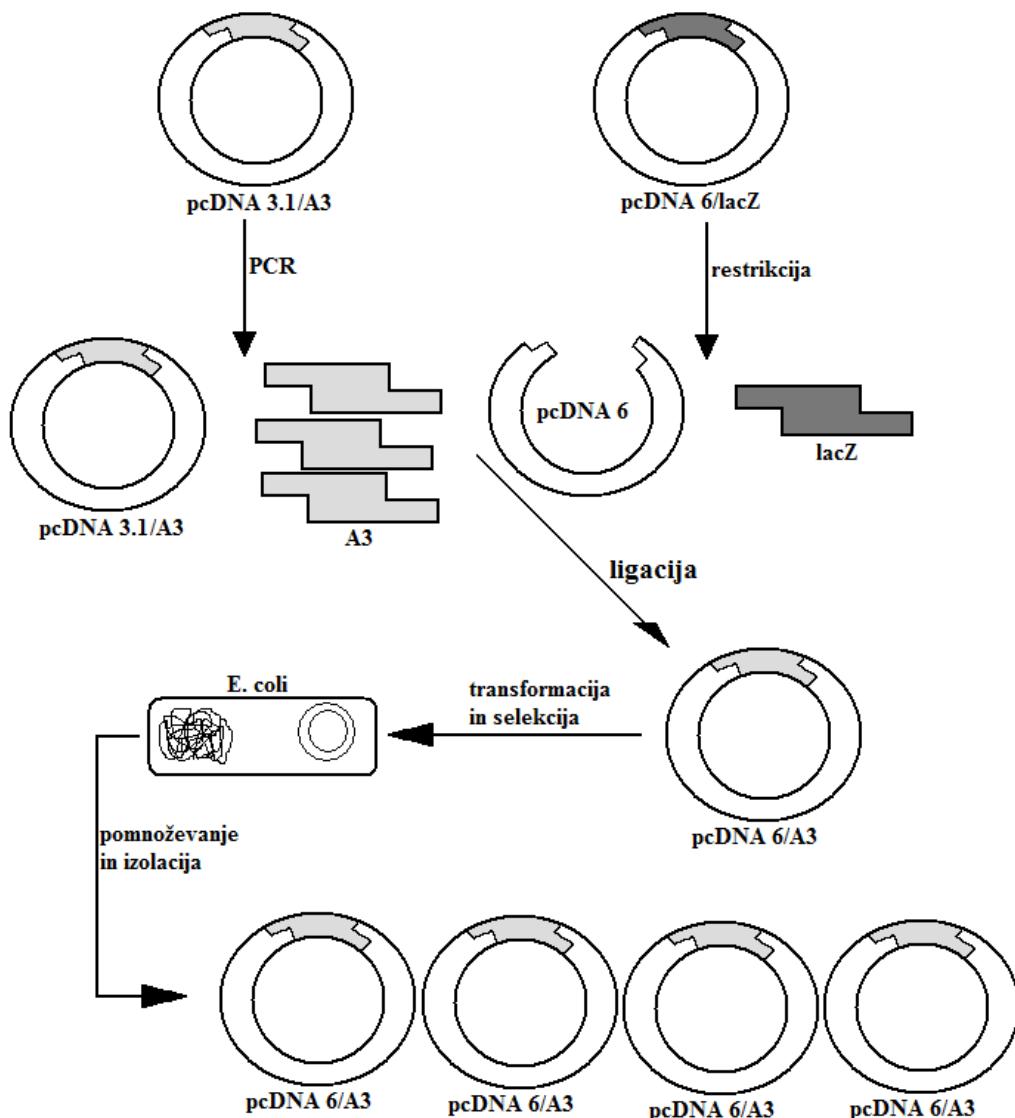
DNA in ekspresiji gena *neo* (slika 15), saj vsebuje transkript retrotranspozona po prvi transkripciji protismiselno kopijo gena *neo*, po reverzni transkripciji pa se gen *neo* prepiše v smiseln smeri.

Neomicinska rezistenca omogoča rezistenco tudi proti antibiotikom, ki so po zgradbi podobni neomicinu (npr. geneticin). Pri selekciji celic z geneticinom bodo rezistentne le tiste celice, v katerih je retrotranspozicija potekla do konca. V primeru, ko retrotranspozicija poteče nepopolno (npr. se ustavi na stopnji intermediata), se gen *neo* ne bo izrazil. Hitrost retrotranspozicije označenega elementa LINE-1 in ZfL2 smo opazovali v prisotnosti posameznih proteinov APOBEC tako, da smo izvedli kotransfekcijo posameznih plazmidov, ki nosijo zapis za proteine A3 in plazmida BZ-25 (z vključenim zaporedjem ZfL2) ali plazmida JM101 (z vključenim zaporedjem LINE-1) v sesalske celice HeLa. Vpliv praznega plazmida pcDNA6 na retrotranspozicijo smo preverili s kotransfekcijo plazmidov pcDNA6 in BZ-25 ali JM101, vzporedno pa smo izvedli tudi transfekcijo zgolj plazmida BZ-25 ali JM101. Celice smo po kotransfekciji prenesli iz plošč s 6 vdolbinicami na 10 cm polistirenske plošče. 48 – 72 ur po kotransfekciji (ob ustrezeni gostoti celic, tj. 85 – 95 % konfluentnosti) smo začeli s selekcijo, kjer smo pripravljeno gojišče DMEM zamenjali z 10 mL gojišča DMEM, ki smo mu predhodno dodali 500 µg geneticina na mililiter gojišča. Vsak dan smo pod mikroskopom spremljali rast celic. Gojišče z geneticinom smo zamenjali z novim vsakih 72 ur. Selekcija je potekala 10 - 12 dni, odvisno od konkretnih rezultatov. Posamezne preživele kolonije namreč ne smejo biti ne premajhne, saj bi jih težko šteli, niti prevelike, ker bi to oteževalo njihovo medsebojno ločevanje.

Preživelim celicam smo odsesali gojišče, jih sprali s 1x fosfatnim pufrom (DPBS) ter fiksirali z metanolom. Po 2 min inkubaciji v metanolu smo le-tega odsesali, sprali z DPBS in celice obarvali z modrim barvilm Trypan Blue (redčen 1 : 5, Sigma). S štetjem obarvanih celic smo ugotovili kateri proteini A3 najbolj inhibirajo retrotranspozicijo ZfL2 retrotranspozona.

4 REZULTATI

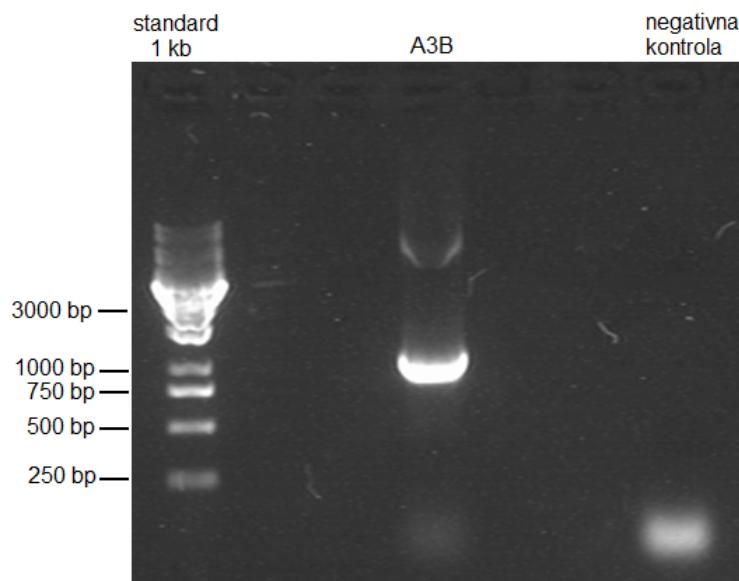
4.1 SUBKLONIRANJE



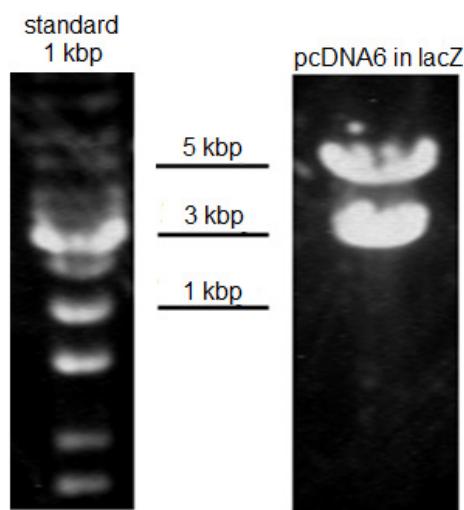
Slika 16: **Shematski prikaz poteka subkloniranja.** Zapis za protein A3B v plazmidu pcDNA3.1 smo pomnožili s PCR in subklonirali v vektor pcDNA6 $\Delta lacZ$. Nov, rekombinantni plazmid smo namnožili v bakterijskih celicah *E. coli*. Selekcija z ampicilinom je ločila tiste celice, ki so sprejele plazmid. Sledila je izolacija rekombinantnega plazmida iz bakterijskih celic. Plazmide smo analizirali z restrikcijo. Pri ustreznih vzorcih smo nazadnje ugotovili nukleotidno zaporedje.

Zapis za protein A3B, ki je bil v plazmidu pcDNATM3.1, smo pomnožili s PCR reakcijo (3.2.1.9). Pri tem smo uporabili oligonukletida N-A3B *Hind*III/s in C-A3B *Xho*I/as. Z

encimoma *HindIII* in *XhoI* smo razrezali (3.2.1.1) plazmid pcDNA6/*lacZ*. Produkt restrikcije in PCR reakcije smo analizirali z agarozno elektroforezo (3.2.1.2) (sliki 17 in 18).

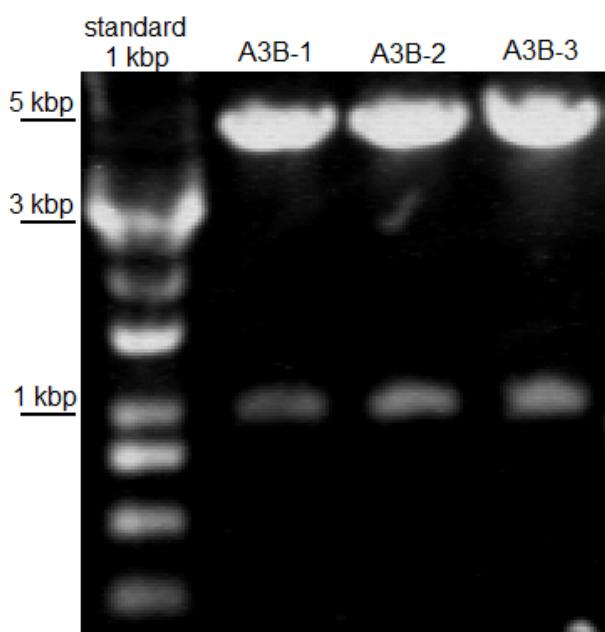


Slika 17: **Slika agarozne elektroforeze produkta PCR (A3B).** Lisa pri A3B predstavlja zapis za A3B z *HindIII* in *XhoI* lepljivima koncema. Lisa pri negativni kontroli (namesto plazmidne DNA smo dodali destilirano vodo) in lisa ustrezne velikosti pri A3B so ostanki dimerjev, nastalih z združitvijo neporabljenih dNTP-jev.



Slika 18: **Slika agarozne elektroforeze restrikcije plazmida pcDNA6/*lacZ*.** Plazmid smo razrezali z encimoma *HindIII* in *XhoI*. Tako smo dobili 2 lisi: zgornja predstavlja bodoči vektor (pcDNA6 Δ *lacZ*), spodnja pa izrezan gen *lacZ*.

Tako insert (zapis za A3B) kot tudi prazen vektor pcDNA6 smo v nadaljevanju izolirali iz gela (3.2.1.3) in ju ligirali (3.2.1.4). Po ligaciji smo ligacijsko zmes transformirali (3.2.1.5) v bakterijske celice *E. coli*, le-te namnožili in iz njih izolirali plazmidno DNA (3.2.1.6). Rekombinantne plazmide smo po transformaciji analizirali z restrikcijo (3.2.1.1) in agarozno elektroforezo (3.2.1.2). Vzorci, pri katerih vidimo sliko dveh lis (pcDNA6 $\Delta lacZ$ ~5 kbp, A3B ~1 kbp), so ustrezni (slika 19).



Slika 19: **Slika agarozne elektroforeze vzorcev restrikcije kloniranih plazmidov.** Pri vseh treh vzorcih je bila ligacija uspešna. Zgornje lise predstavljajo prazen vektor pcDNA6 $\Delta lacZ$, spodnje pa insert A3B.

Vzorce smo nato poslali na določevanje nukleotidnega zaporedja (MWG Biotech, Nemčija. Ustrezne vzorce smo uporabili v nadaljnjih poskusih.

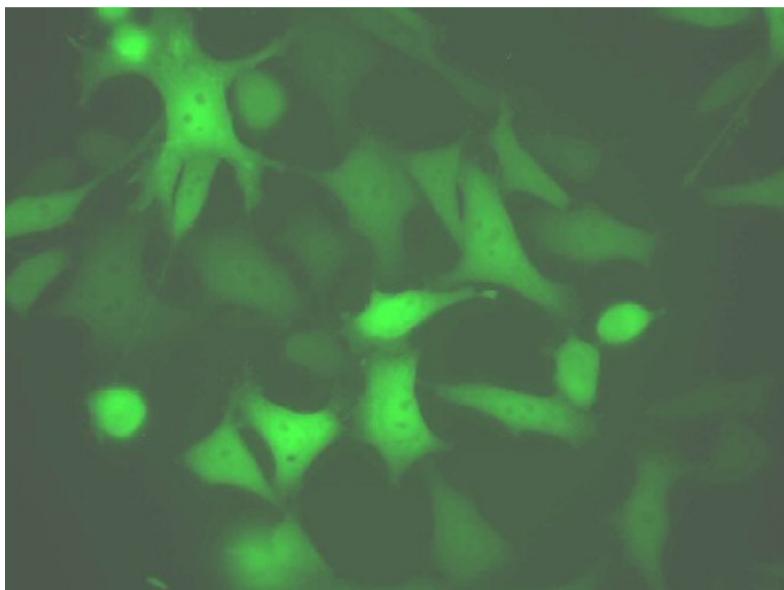
Tako smo pripravili plazmid pcDNA6 z zapisom za A3B protein. Plazmide pcDNA6 z zapisi za ostale nemutirane proteine in protein N-A3B smo dobili že pripravljene. Plazmida pcDNA6 z zapisoma za proteina mut-A3A in mut-A3B pa smo pripravili s točkovno mutagenezo zapisov za proteina A3A in A3B (3.2.1.8).

4.2 EKSPRESIJA PROTEINOV APOBEC

Za potrditev ekspresije proteinov A3 v sesalskih celicah smo plazmide pcDNA6 z zapisom za proteine A3 najprej transficirali (3.2.2.4) v sesalske celice 293T. Nato smo celice lizirali (3.2.2.5), ločili proteine v lizatu s poliakrilamidno elektroforezo (3.2.2.6) ter potrdili prisotnost posameznih proteinov A3 v vzorcu s postopkom prenosa po Westernu (3.2.2.7).

4.2.1 Učinkovitost transfekcije

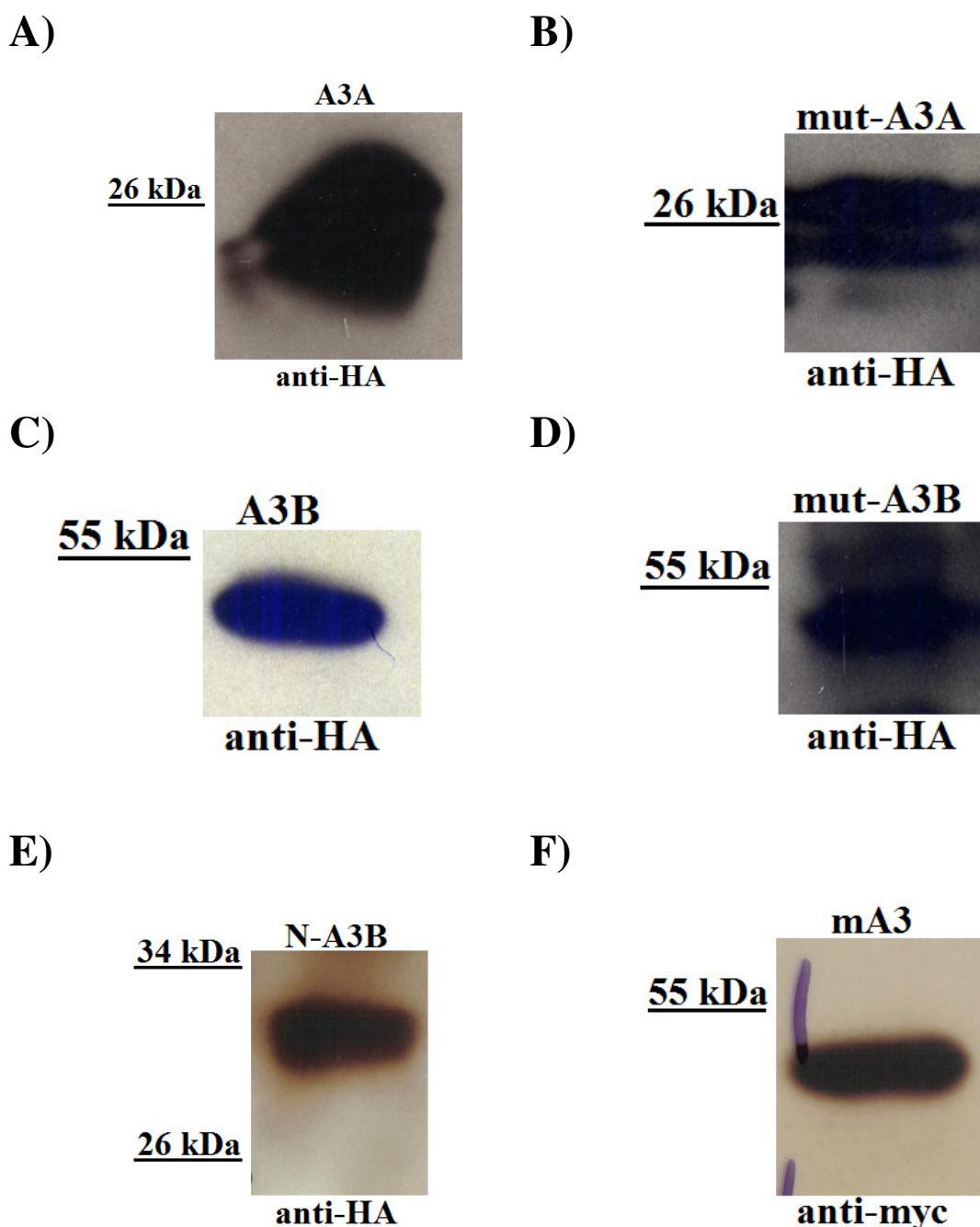
Učinkovitost transfekcije plazmidov pcDNA6/APOBEC smo ugotovili s primerjavo učinkovitosti transfekcije plazmida z zapisom za zeleni fluorescenčni protein (GFP) v celice 293T, tako da smo pod fluorescenčnim mikroskopom opazovali prisotnost ekspresiranega proteina GFP (slika 20). Celice z uspešno ekspresiranim GFP so bile pod mikroskopom videti zelene. Število obarvanih celic smo primerjali s številom vseh celic v vidnem polju. Ocenili smo, da je približno 90% celic sprejelo plazmid. Pri tem smo predpostavili, da je učinkovitost transfekcije rekombinantnih plazmidov pcDNA6/APOBEC enaka učinkovitosti transfekcije plazmida, ki nosi GFP.



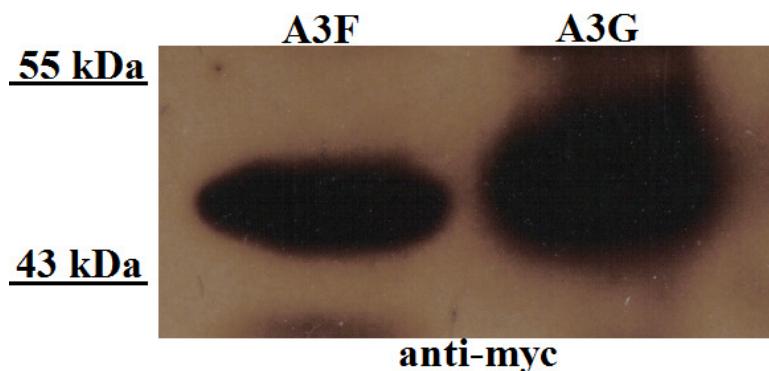
Slika 20: **Prikaz celic HeLa, v katerih se je izrazil zeleni fluorescenčni protein (GFP), pod mikroskopom po osvetlitvi z UV svetlobo.** Celice HeLa smo transficirali s plazmidom z zapisom za GFP. Po približno 48-ih urah smo jih opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom pri 40x povečavi in posneli fotografijo.

4.2.2 Učinkovitost ekspresije proteinov APOBEC

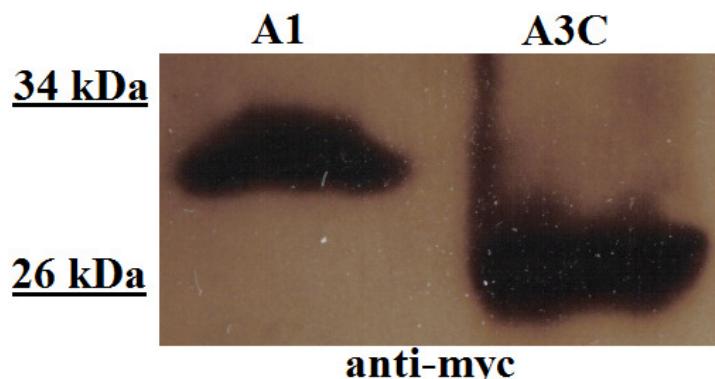
Plazmide z zapisom za proteine A3 smo transficirali (3.2.2.4) v celice 293T, po 48 urah celice lizirali (3.2.2.5), proteine v lizatu ločili po velikosti z NaDS-PAGE (3.2.2.6) ter jih nazadnje prenesli na membrano s prenosom po Westernu (3.2.2.7). Velikost lis na filmu ustreza proteinom A3 ter proteinu A1 (slika 21). A3A, N-A3B, A3C in A1 so veliki od 26 do 34 kDa, A3B, A3F, A3G in mA3 pa med 43 in 55 kDa [157].



G)



H)



Slika 21: Analiza ekspresije proteinov A3 v sesalskih celicah 293T s prenosom po Westernu. Proteina A3A in mut-A3A ustrezata velikosti ~25 kDa, detektirali pa smo ju z anti-HA protitelesi (A, B). Enako detekcijo smo izvedli tudi za proteine A3B, mut-A3B ter N-A3B, pri čemer je velikost prvih dveh ~50 kDa (C, D), zadnjega pa ~30 kDa (E). Z anti-myc protitelesi smo izvedli detekcijo proteinov mA3, A3F in A3G, ki imajo vsi molekulsko maso ~50 kDa (F, G), ter proteinov A1 z maso ~30 kDa in A3C z molekulsko maso ~26 kDa (H).

4.3 STOPNJA RETROTRANSPOZICIJE

Pri ugotavljanju hitrosti retrotranspozicije v prisotnosti proteina A3 smo uporabili retrotranspozona, ki sta označena z genom za neomicinsko rezistenco (gen *neo*). Ta gen omogoča rezistenco tudi proti antibiotikom, ki so po strukturi podobni neomicinu, zato smo v poskusih uporabili antibiotik geneticin. Rezistenca proti neomicinu se izrazi, če pride do reverzne transkripcije, integracije kopije retrotranspozona v genom ter ekspresije retrotranspozona in z njim gena *neo*. Netransfisirane celice HeLa v prisotnosti antibiotika

niso preživele. Nasprotno so celice, transficirane le s plazmidom, ki je nosil retrotranspozon, preživele, saj je retrotranspozicija lahko potekla nemoteno. Celice, kotransficirane s plazmidom, ki je imel retrotranspozon in plazmidom pcDNA6, so prav tako preživele, saj pcDNA6 ni vseboval zapisa za protein A3, ki bi lahko inhibiral retrotranspozicijo.

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

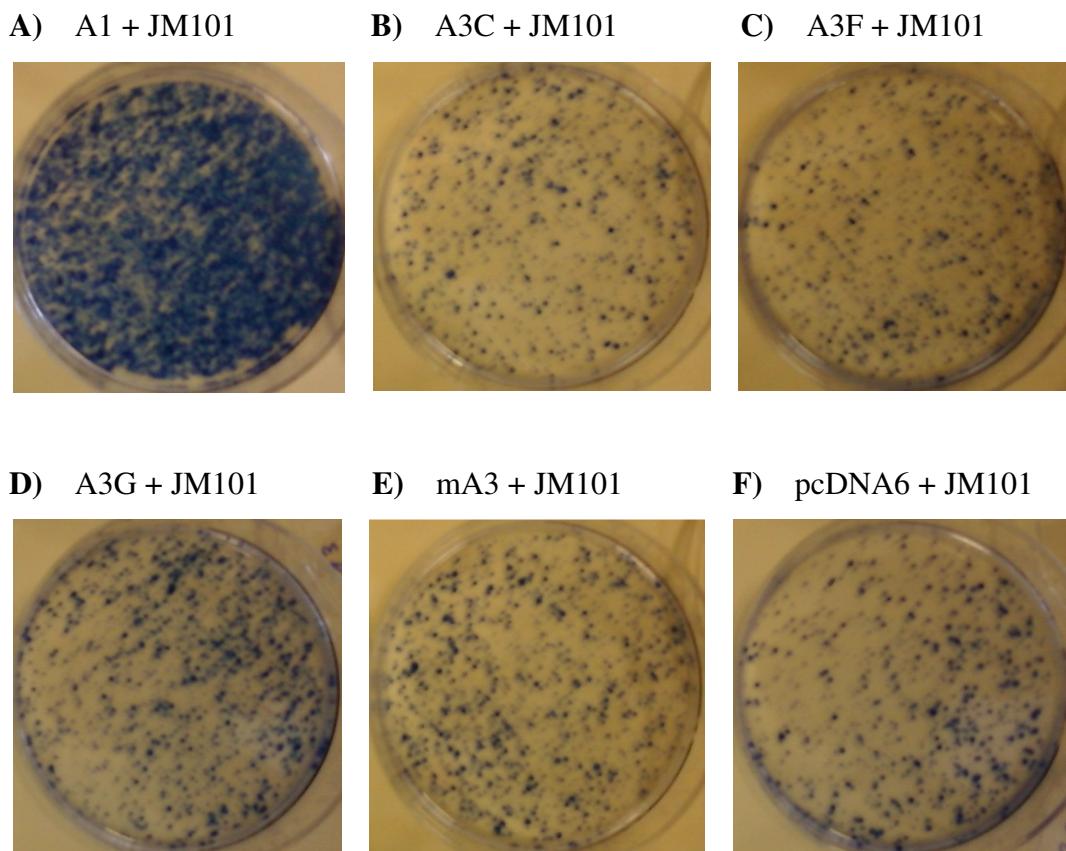
- ⇒ % retrotranspozicije = n / N , kjer je
 - ⇒ n: število preživelih celic v prisotnosti proteina A3 in retrotranspozona ZfL2 oz. LINE-1;
 - ⇒ N: število preživelih celic v prisotnosti praznega plazmida pcDNA6 in elementa ZfL2 oz. LINE-1.

Večje število preživelih celic po selekciji z genetinom je pomenilo, da določen protein A3 manj inhibira ali pa sploh ne inhibira retrotranspozicije in obratno.

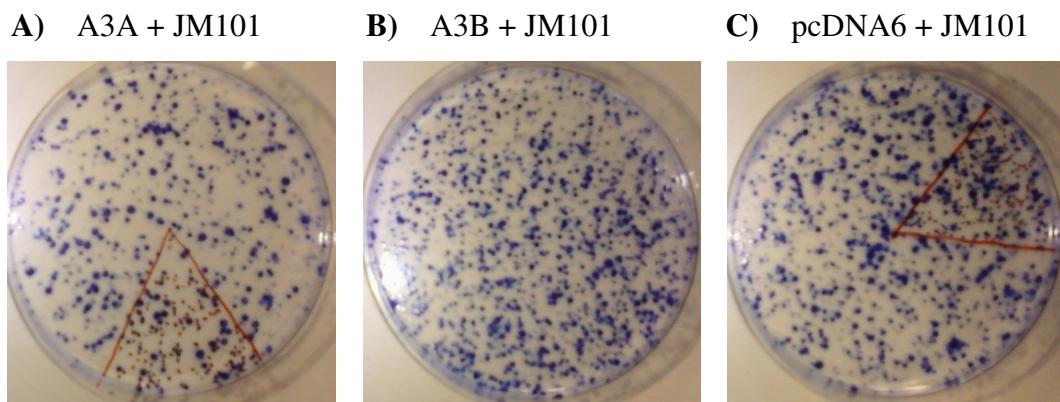
V poskusu smo naredili tudi negativne kontrole – celice HeLa transficirane le s proteini APOBEC ter praznim vektorjem. V nobenem primeru ni zrasla niti ena sama kolonija. To pomeni, da so preživele kolonije na ostalih ploščah izključno posledica uspešne retrotranspozicije elementa LINE-1 oz. ZfL2.

4.3.1 Stopnja retrotranspozicije ob prisotnosti nemutiranih proteinov APOBEC

Pri inhibiciji retrotranspozicije elementa LINE-1, katerega zapis je vseboval plazmid JM101, se je kot najučinkovitejši izkazal A3A, sledita A3F in A3G, stopnjo retrotranspozicije pa celo rahlo povečajo A3B, A3C in mA3. Izmed vseh pa najbolj izstopa A1. Le-ta močno pospeši retrotranspozicijo in to kar za približno 4-krat (slika 27). Slike 22 in 23 prikazujeta posamezne plošče z obarvanimi kolonijami celic, ki so preživele selekcijo z genetinom.



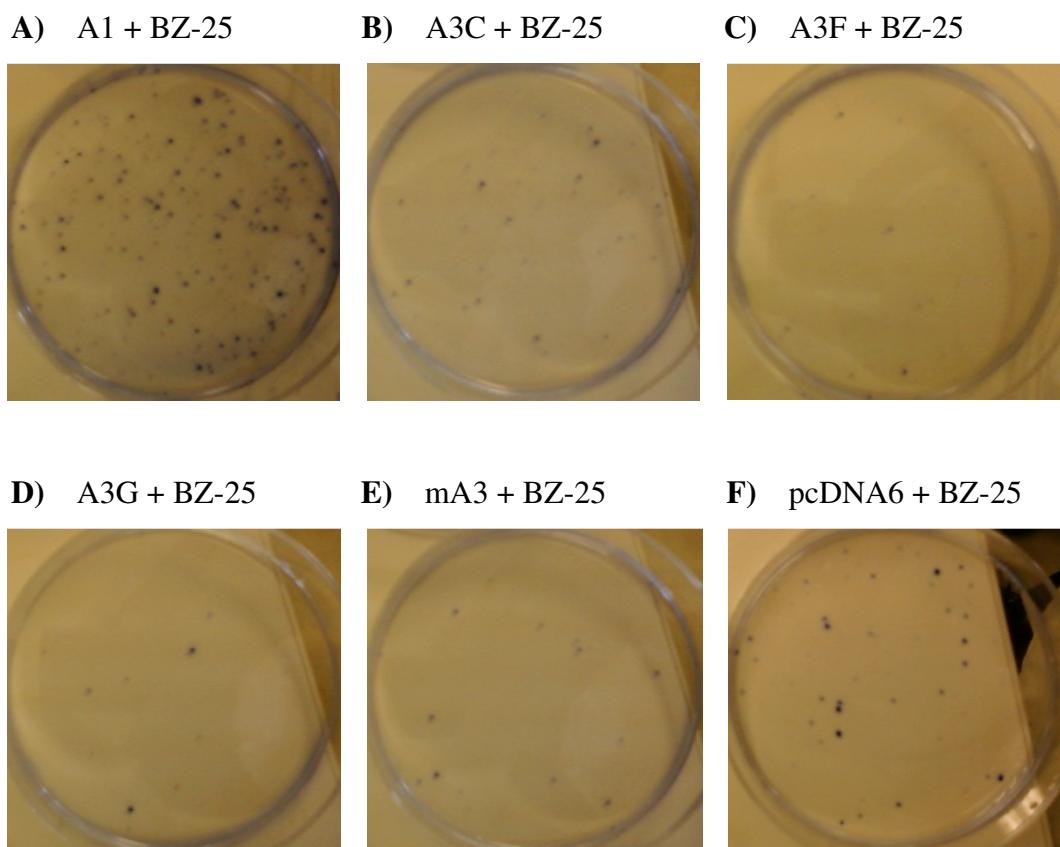
Slika 22: **Aktivnost retrotranspozona LINE-1 ob prisotnosti proteinov A1, A3C, A3F, A3G in mA3 oz. praznega vektorja.** Izvedli smo kotransfekcijo, in sicer plazmida JM101 pri vseh vzorcih ter plazmidov z zapisom za A1 (A), A3C (B), A3F (C), A3G (D) in mA3 (E) ter praznega vektorja pcDNA6 (F). Število preživelih kolonij pri slednjem vzorcu nam je predstavljalo referenčno vrednost.



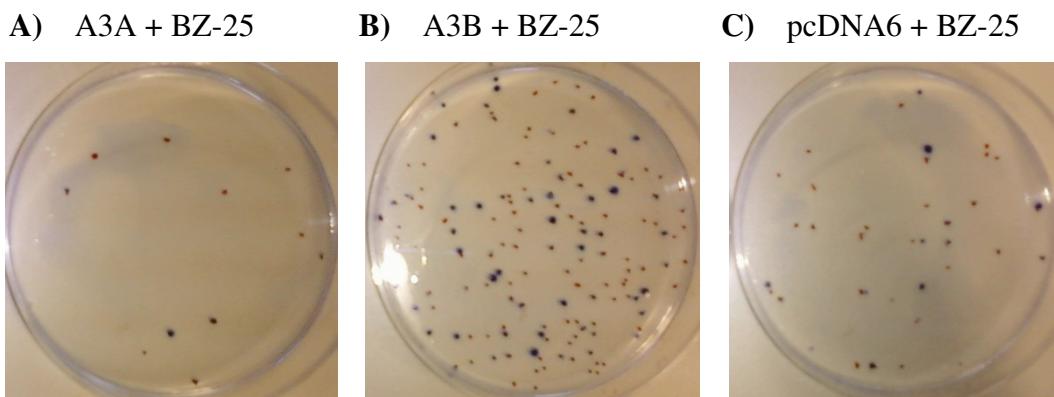
Slika 23: **Aktivnost retrotranspozona LINE-1 ob prisotnosti proteinov A3A in A3B oz. praznega vektorja.** Izvedli smo kotransfekcijo, in sicer plazmida JM101 pri obeh vzorcih ter plazmidov z zapisom za A3A (A) in A3B (B) ter praznega vektorja pcDNA6 (C). Število preživelih kolonij slednjega vzorca nam je predstavljalo referenčno vrednost.

Podobne rezultate smo dobili tudi pri inhibiciji retrotranspozicije retrotranspozona ZfL2, katerega zapis je vseboval plazmid BZ-25. Ta poskus smo, razen za A3A, A3B in A3F, izvedli v dveh ponovitvah, zato so ti rezultati statistično verodostojnejši od rezultatov, ki niso izvedeni v dveh ponovitvah. Odstotek inhibicije smo izrazili kot povprečje odstotkov inhibicije posameznih ponovitev.

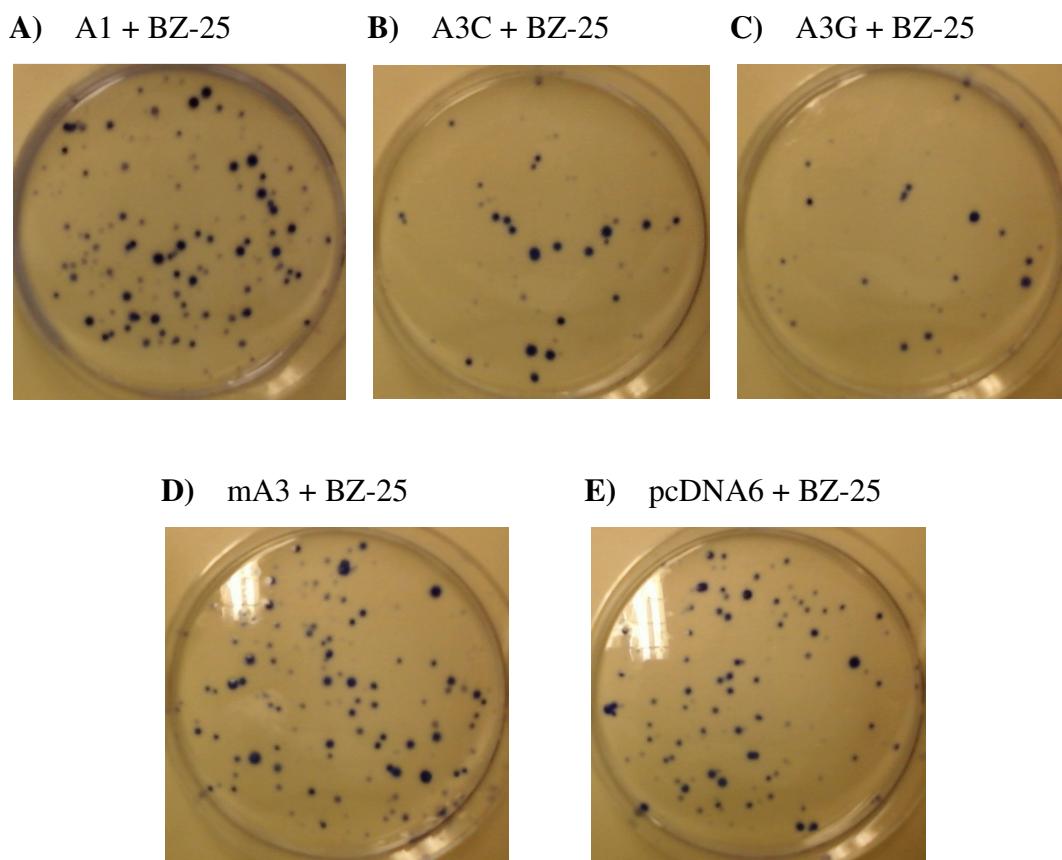
Zopet je najučinkovitejši A3A, njemu primerljivo inhibicijo pa v tem primeru kaže tudi A3G. Sledita jima A3F, A3C in mA3, ki sicer kažejo nižjo stopnjo inhibicije, a še vseeno dokaj zaznavno. Izrazito odstopanje pa je, kot v primeru elementa LINE-1, tudi tu pri A1 (pospešitev retrotranspozicije za približno 3,5-krat), močno pa odstopa tudi A3B (približno 3-kratna pospešitev) (slika 27). Na slikah 24, 25 in 26 so prikazane posamezne plošče z obarvanimi kolonijami celic, ki so preživele selekcijo z genetičinom.



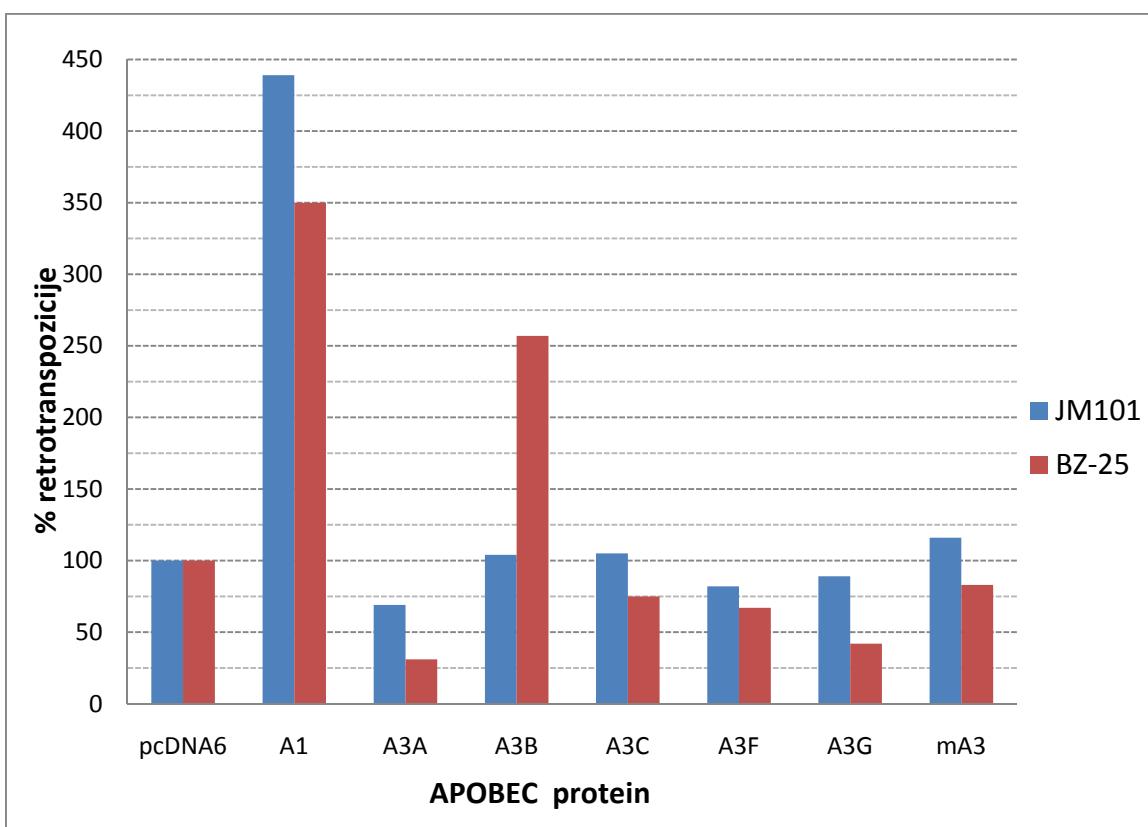
Slika 24: Aktivnost retrotranspozona ZfL2 ob prisotnosti proteinov A1, A3C, A3F, A3G in mA3 oz. praznega vektorja. Izvedli smo kotransfekcijo, in sicer plazmida BZ-25 pri vseh vzorcih ter plazmidov z zapisom za A1 (**A**), A3C (**B**), A3F (**C**), A3G (**D**) in mA3 (**E**) ter praznega vektorja pcDNA6 (**F**). Število preživelih kolonij pri slednjem vzorcu nam je predstavljalo referenčno vrednost.



Slika 25: Aktivnost retrotranspozona ZfL2 ob prisotnosti proteinov A3A in A3B oz. praznega vektorja. Izvedli smo kotransfekcijo, in sicer plazmida BZ-25 pri obeh vzorcih ter plazmidov z zapisom za A3A (A) in A3B (B) ter praznega vektorja pcDNA6 (C). Število preživelih kolonij slednjega vzorca nam je predstavljalo referenčno vrednost.



Slika 26: Aktivnost retrotranspozona ZfL2 ob prisotnosti proteinov A1, A3C, A3G in mA3 oz. praznega vektorja. Izvedli smo kotransfekcijo, in sicer plazmida BZ-25 pri vseh vzorcih ter plazmidov z zapisom za A1 (A), A3C (B), A3G (C) in mA3 (D) ter praznega vektorja pcDNA6 (E). Število preživelih kolonij pri slednjem vzorecu nam je predstavljalo referenčno vrednost.



Slika 27: Prikaz stopnje retrotranspozicije posameznega retrotranspozona ob prisotnosti posameznih proteinov APOBEC glede na retrotranspozicijo pri kotransfekciji s praznim vektorjem pcDNA6. Kot najučinkovitejši inhibitor retrotranspozicije obeh retrotranspozonov se izkaže A3A, kot največji induktor pa A1, tako pri LINE-1 kot ZfL2. Dobro je opazno tudi dejstvo, da so razen A3B vsi učinkovitejši inhibitorji oz. šibkejši induktorji retrotranspozona ZfL2 kot pa retrotranspozona LINE-1.

4.3.2 Stopnja retrotranspozicije ob prisotnosti mutiranih proteinov APOBEC

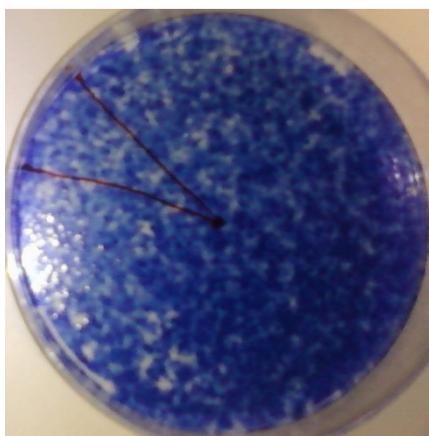
V poskusu smo uporabili tudi dve mutanti, ki imata točkovni mutaciji v encimsko aktivnem citidin deaminaznem predelu, in sicer:

- ⇒ mutanta mut-A3A ima v primerjavi z divjim tipom A3A na 72-em mestu alanin namesto glutaminske kisline. Torej smo izvršili zamenjavo negativne in polarne aminokisline z nevtralno in nepolarno;
- ⇒ mutanta mut-A3B ima v primerjavi z divjim tipom A3B na 68-em mestu glutamin namesto glutaminske kisline. Torej smo izvršili zamenjavo negativne in polarne aminokisline z nevtralno in prav tako polarno.

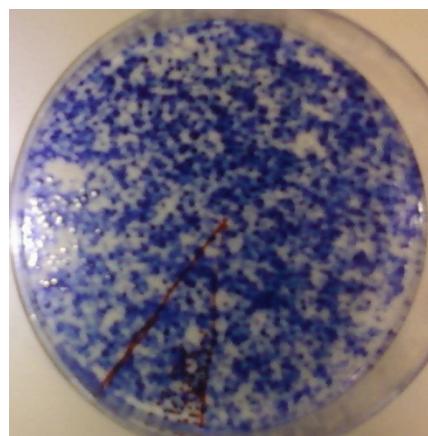
Poleg tega smo v poskusu uporabili še N-A3B (192 aminokislin), ki se od divjega tipa A3B razlikuje po tem, da nima C-terminalne domene (190 aminokislin). Takšnemu proteinu v celoti manjka domena CDA.

V poskusu smo opazili, da nobena mutanta ne zmanjša stopnje retrotranspozicije. Aktivnost N-A3B je pri obeh retrotranspozonih nevtralna, mut-A3B pospeši retrotranspozicijo obeh retrotranspozonov za okoli 3 – 4-krat, pri mut-A3A pa je pospešitev še večja – od približno 5 do 8-kratna.

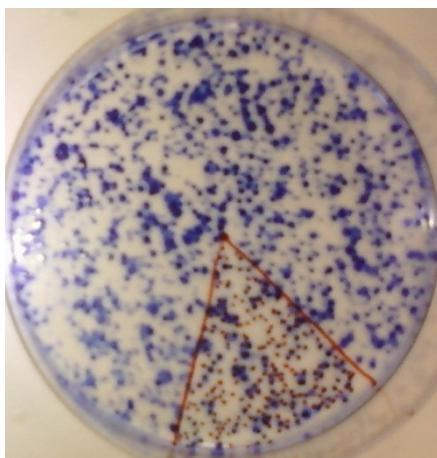
A) mut-A3A + JM101



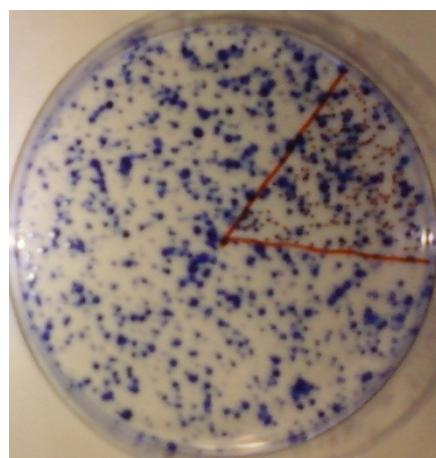
B) mut-A3B + JM101



C) N-A3B + JM101

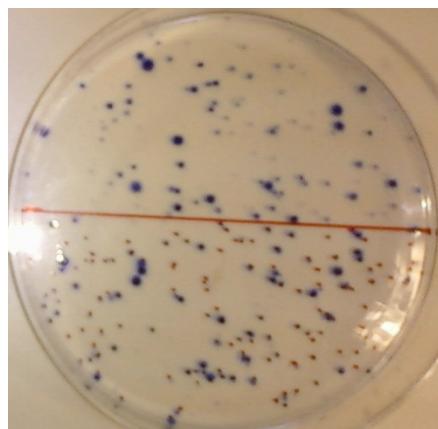


D) pcDNA6 + JM101

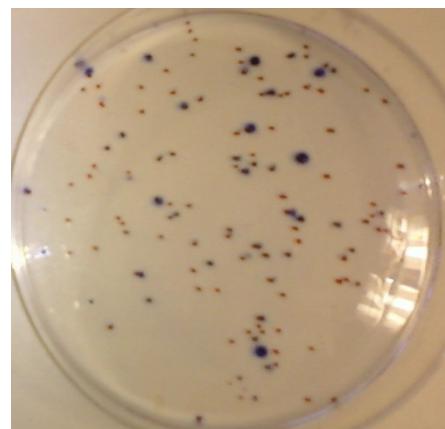


Slika 28: Aktivnost retrotranspozona LINE-1 ob prisotnosti proteinov mut-A3A, mut-A3B in N-A3B oz. praznega vektorja. Izvedli smo kotransfkcijo, in sicer plazmida JM101 pri obeh vzorcih ter plazmidov z zapisom za mut-A3A (**A**), mut-A3B (**B**) in N-A3B (**C**) ter praznega vektorja pcDNA6 (**D**). Število preživelih kolonij slednjega vzorca nam je predstavljalo referenčno vrednost.

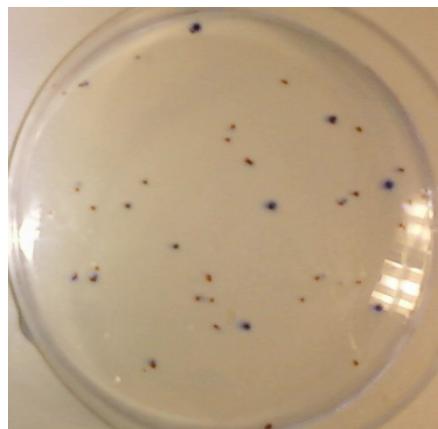
A) mut-A3A + BZ-25



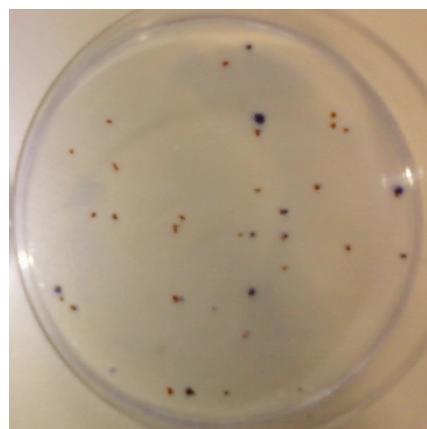
B) mut-A3B + BZ-25



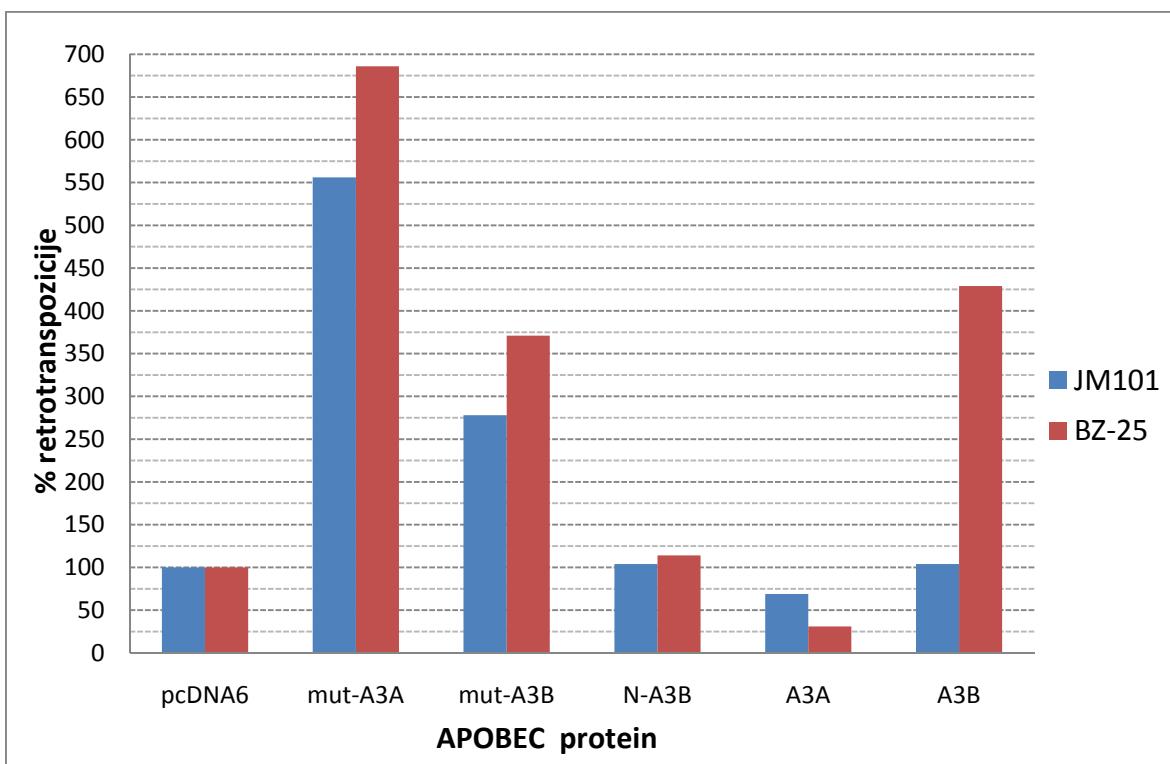
C) N-A3B + BZ-25



D) pcDNA6 + BZ-25



Slika 29: Aktivnost retrotranspozona ZfL2 ob prisotnosti proteinov mut-A3A, mut-A3B in N-A3B oz. praznega vektorja. Izvedli smo kotransfekcijo, in sicer plazmida BZ-25 pri obeh vzorcih ter plazmidov z zapisom za mut-A3A (A), mut-A3B (B) in N-A3B (C) ter praznega vektorja pcDNA6 (D). Število preživelih kolonij slednjega vzorca nam je predstavljalo referenčno vrednost.



Slika 30: Prikaz stopnje retrotranspozicije posameznega retrotranspozona ob prisotnosti posameznih točkovnih mutant proteinov APOBEC glede na retrotranspozicijo pri kotransfekciji s praznim vektorjem pcDNA6. Nobena izmed točkovnih mutant ne pokaže inhibitornega učinka na retrotranspozicijo katerega izmed retrotranspozonov. N-A3B praktično nima učinka, mut-A3B deluje kot pospeševalec, mut-A3A pa kot močan pospeševalec retrotranspozicije. V tem primeru pa je dobro opazno, da vsi šibkeje inducirajo retrotranspozon LINE-1 kot pa retrotranspozon ZfL2. Za primerjavo sta prikazani stopnji retrotranspozicije divjega tipa proteinov A3A in A3B.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Ekspresija proteinov A3

Proteini APOBEC vplivajo na retrotranspozicijo elementa LINE-1 z blokiranjem reverzne transkripcije in integracije kopij retrotranspozonov v genom [140]. Ker smo želeli preveriti, ali hipoteza velja tudi za elemente LINE-2 ter kakšen je vpliv mutant, smo morali na začetku preveriti, ali sploh pride do ekspresije proteinov A3, ko plazmid z zapisom zanke vnesemo v sesalske celice. Uspešna ekspresija proteinov A3 v celicah je pogoj za izrazitev njihovega učinka na retrotranspozicijo.

Pokazali smo, da se v celicah 293T ekspresirajo vsi proteini A3 - glede na jakost signala na filmu s približno enako stopnjo, z izjemo A3A in A3G, pri katerima je opazna rahlo povečana ekspresija. Ta minimalna odstopanja bi lahko bila posledica različnega števila transficiranih celic pri posameznih vzorcih. Navkljub natančnemu nacepljanju celic lahko namreč pride do majhnih odstopanj v številu celic posamezne vdolbine "6-well plošče". Dalje so možna tudi odstopanja pri učinkovitosti same transfekcije. Četudi bi bilo število celic v vsaki vdolbini enako, bi se zaradi naključnosti transfekcije njena učinkovitost pri posameznih vzorcih lahko delno razlikovala glede na referenčno vrednost transfekcije (proteina GFP). Vendar zaradi pričakovanega minimalnega odstopanja v učinkovitosti transfekcije za potrebe našega eksperimenta privzamemo enako učinkovitost transfekcije pri vseh vzorcih. Tako so lise na filmu sorazmerne stopnji ekspresije posameznih proteinov, za manjša odstopanja v ekspresiji pa vidimo vzrok v samem genu za določen protein, ki tako ali drugače vpliva na samo ekspresijo proteina,

Količino proteinov (število celic, uporabljenih v eksperimentu) pri vseh vzorcih lahko preverimo na dva načina. Pri prvem pred nanosom lizata na gel za NaDS-PAGE izmerimo koncentracijo vseh proteinov v vzorcih z Bradfordovo oziroma Bio-radovo metodo. Nato na gel nanesemo ustrezен volumen posameznega vzorca, da je količina proteinov povsod enaka. Pri drugem načinu pa membrano, ki smo jo uporabili pri postopku prenosa po

Westernu, izpostavimo primarnim protitelesom proti proteinu, za katerega vemo, da se ekspresira v vseh celicah (npr. aktin, gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza). V tem primeru morajo biti izražene lise na filmu enake pri vseh vzorcih.

5.1.2 Stopnja retrotranspozicije

Stopnja inhibitornega učinka je pri različnih predstavnikih proteinov A3 različna. Retrotranspozicijo elementa LINE-1 najbolj inhibirajo proteini A3A, A3B in A3F, najmanj pa protein A3G [20, 21, 139, 157]. Želeli smo preveriti ali imajo proteini A3 enak učinek pri retrotranspozoni ZfL2, za kar smo uporabili modelni retrotranspozon ZfL2, ter te učinke primerjati z učinki na LINE-1. Študije inhibitornega učinka proteinov A3 na retrotranspozicijo LINE-1 se med seboj zelo razlikujejo, saj na rezultat eksperimenta vplivajo različni dejavniki, kot so vrsta sesalskih celic, v katerih izvajamo eksperiment, starost celic (število precepitev), vrsta gojišča, uporaba/neuporaba gojišču dodanih antibiotikov, vrsta fetusnega seruma goveda (FBS), vrsta in tip vektorja, s katerim vnesemo zapis za protein A3 v celice in drugi. Omenjeni dejavniki bi lahko vplivali tudi na rezultate eksperimenta z retrotranspozonom ZfL2, zato bi bilo potrebno izvesti veliko število ponovitev eksperimenta, da bi dobili statistično verodostojnejše podatke inhibitornega učinka proteinov A3 na retrotranspozicijo retrotranspozona ZfL2 retrotranspozona.

5.1.2.1 Stopnja retrotranspozicije ob prisotnosti nemutiranih proteinov APOBEC

Rezultati eksperimenta le delno potrjujejo hipotezo o inhibitornem učinku proteinov A3. Pri inhibiciji retrotranspozicije elementa LINE-1 so se kot aktivni izkazali le A3A (~30-odstotna inhibicija), A3F (~20-odstotna inhibicija) in A3G (~10-odstotna inhibicija), nobenih učinkov pa nista pokazala A3B in A3C. A3B torej v našem poskusu ni med najizrazitejšimi inhibitorji LINE-1, kljub temu, da so drugi raziskovalci to potrdili [20, 21, 23], učinki A3A pa se s to predpostavko skladajo [20, 21, 23, 139, 155], le da je v eni izmed raziskav A3A retrotranspozicijo celo rahlo pospešil [161]. Tudi A3G se ni izkazal kot najslabši inhibitor, kot je bilo ugotovljeno predhodno [20, 21, 139].

Povsem proti pričakovanjem so rezultati za protein mA3, ki retrotranspozicijo pospeši za ~20%. Drugi raziskovalci takšnih rezultatov niso dobili [161, 102]. Naše rezultate lahko pojasnimo z dejstvom, da je mA3 mišji protein A3, ki se je tekom evolucije prilagodil inhibiciji retrotranspozicije mišjih mobilnih genetskih elementov, v poskusu uporabljeni element LINE-1 pa je človeškega izvora. Vendar je na tak način moč razložiti le odsotnost inhibicije proteina mA3, ne pa tudi njegove pospešitve retrotranspozicije.

Protein A1 je v našem primeru retrotranspozicijo pospešil za ~340%. Rezultat si razlagamo z dejstvom, da A1 tako ali tako nima primarne funkcije inhibicije retrotranspozicije, temveč je udeležen pri metabolizmu lipidov kjer specifično spremeni citidinski ostanek na mestu 6666 v mRNA molekuli apolipoproteina B (apoB) v uridinskega [1, 8]. Navkljub vsemu pa drži, da inhibitoren vpliv na retrotranspozicijo ne bi bil presenečenje, saj so drugi raziskovalci [168 – 170] pokazali antivirusni učinek proteina A1 ter njegovo sposobnost deaminacije citozinov v molekulah RNA in enoverižnih DNA.

Pri inhibiciji retrotranspozicije ZfL2 so rezultati le delno podobni rezultatom vpliva proteinov A3 na element LINE-1. Najučinkovitejši je A3A (70 odstotna inhibicija), njemu primerljivo deluje A3G (60- odstotna inhibicija), sledijo pa jima A3F, A3C in mA3 s ~30, ~25 in ~15 odstotno inhibicijo retrotranspozicije. Zopet najbolj izstopa A1, ki tudi v tem primeru pospeši proces kar za ~250%. Največje presenečenje pa je A3B, saj naj bi bil po pričakovanjih eden najmočnejših inhibitorjev, v poskusu pa je mobilizacijo retroelementa ZfL2 pospešil kar za ~150%. Torej se z našo hipotezo ne sklada le A3B.

Učinke A1 na retrotranspozicijo ZfL2 razlagamo podobno kot za njegov primer učinkovanja na element LINE-1. Razlogi za odsotnost inhibitornega učinka A3B na retrotranspozicijo so lahko raznoliki. Dejstvo je, da lahko skozi jedrne pore pasivno difundirajo le molekule, manjše od ~40 kDa [21], kar pa A3B zagotovo ni. Vendar so njegovo prisotnost v jedru potrdili [20], tako da, ali je njegova prisotnost v jedru pod pragom fiziološkega učinkovanja na retrotranspozicijo, ali pa so vzroki povsem drugi.

Da sta pri inhibiciji retrotranspozicije elementa ZfL2 najučinkovitejša A3A in A3G, je verjetno povezano z njuno večjo ekspresijo v primerjavi z ostalimi proteini. To potrjuje

tudi njuna relativno močna inhibicija elementa ZfL2, ki kot tak izkazuje relativno nizko aktivnost. Manjša kot je stopnja retrotranspozicije nekega retrotranspozona, večji je učinek inhibicije, ki ga neko povečanje količine proteina povzroči. Povedano drugače: pri majhni aktivnosti retrotranspozona že majhno povečanje količine inhibitorja doprinese relativno velik delež k skupnemu deležu inhibicije in obratno.

Če pogledamo učinke vseh proteinov na oba retroelementa, opazimo, da so v grobem učinki posameznega proteina pri enem elementu sorazmerni njegovemu učinku pri drugem elementu v primerjavi z ostalimi proteini, z izjemo A3B. To je smiselno, saj sta si elementa LINE-1 in ZfL2 glede zgradbe in funkcije dosti bolj podobna, kot pa različna.

Opazimo tudi, da vsi蛋白 učinkoviteje inhibirajo aktivnost ZfL2. Kot je razvidno s slike 31, je LINE-1 precej aktivnejši kot ZfL2. Ker smo v obeh primerih transficirali enako količino vektorja z zapisom za protein APOBEC, je bila posledično tudi količina ekspresiranega proteina v obeh primerih kotransfekcije enaka. Določena količina proteina pa ima neko zgornjo mejo inhibitornega učinkovanja, kar pomeni, da v primeru velike aktivnosti retrotranspozona to predstavlja manjši delež inhibicije, in obratno. Na podlagi teh podatkov ne moremo reči, ali proteini APOBEC močneje inhibirajo mobilnost ZfL2 tudi zaradi kakšnega drugega razloga, bodisi zgradbe, mehanizma replikacije, ali česa tretjega. V ta namen bi morali zasnovati poskus, pri katerem bi izničili vpliv različne aktivnosti retrotranspozonov. Tako bi v našem primeru elementu LINE-1 kotransficirali 13-krat večjo količino zapisa za proteine APOBEC kot elementu ZfL2, saj je slednji manj aktiven za faktor 13.

5.1.2.2 Stopnja retrotranspozicije ob prisotnosti mutiranih proteinov APOBEC

Predpostavljali smo, da odsotnost encimske aktivnosti (tj. točkovna mutacija v katalitični regiji) ne bo vplivala na inhibitoren učinek proteinov A3 na retrotranspozicijo. Našo hipotezo smo ovrgli, saj točkovne mutante ne izkazujejo nikakršnega inhibitornega učinka. N-A3B je sicer pokazal nekaj odstotno pospešitev, ki pa je statistično neznačilna, zato lahko njegov vpliv na retrotranspozicijo obeh elementov označimo kot nevtralen. Mut-

A3B poveča aktivnost elementov LINE-1 in ZfL2 za približno 3-krat, mut-A3A pa za približno 6-krat.

Da protein N-A3B ne vpliva na retrotranspozicijo, ni presenetljivo. Predel s CDA aktivnostjo pri proteinu A3B nosi C-terminalna domena. Tako kot pri A3A, sicer encimska aktivnost za inhibicijo retrotranspozicije ni potrebna [20, 21], je pa potrebna intaktna domena CDA za specifično interakcijo z LINE-1 ribonukleoproteinskim kompleksom [21]. S tem lahko razložimo tudi odsotnost inhibicije pri mut-A3A in mut-A3B, ne pa tudi povečano stopnjo retrotranspozicije. Očitno mutacija ene aminokisline v drugo spremeni strukturo samega proteina (in posledično funkcijo) tako, da neposredno ali posredno pozitivno vpliva na aktivnost elementov LINE-1 in ZfL2. Našo domnevo, da je vzrok konformacijska sprememba samega proteina, potrjuje dejstvo, da je pospešitev retrotranspozicije večja pri mut-A3A (pri katerem smo z mutacijo negativno in polarno aminokislino spremenili v nevtralno in polarno) v primerjavi z mut-A3B (kjer smo prav tako negativno in polarno aminokislino spremenili v nevtralno in polarno). Bolj kot se zamenjani aminokislini kemijsko razlikujeta, večji je lahko vpliv na strukturo proteina.

V primeru posameznih nemutiranih proteinov A3 je imel element LINE-1 višjo relativno aktivnost kot element ZfL2, kar smo razložili z različnima aktivnostima retrotranspozonov *per se*. Na enak način razlagamo rezultate pri mutiranih proteinih, le da je sedaj situacija obrnjena – element ZfL2 je ob prisotnosti posamezne točkovne mutante aktivnejši kot element LINE-1. Aktivnost ZfL2 je občutno manjša kot aktivnost LINE-1, zato bo tudi pozitiven vpliv proteinov A3 na njegovo retrotranspozicijo izrazitejši kot pri že tako ali tako zelo aktivnem LINE-1.

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov eksperimenta lahko zaključimo naslednje:

- ➔ ekspresija posameznih proteinov APOBEC v celicah 293T je primerljiva, z izjemo A3A in A3G, ki se ekspresirata nekoliko bolje kot ostali proteini;
- ➔ na proces retrotranspozicije elementa LINE-1 delujejo inhibitorno A3A, A3F in A3G, statistično značilnega vpliva niso pokazali A3B, A3C in N-A3B, mA3 rahlo poveča retrotranspozicijo, A1, mut-A3A in mut-A3B pa retrotranspozicijo močno pospešijo;
- ➔ na proces retrotranspozicije elementa ZfL2 delujejo inhibitorno A3A, A3G, A3F, A3C in mA3, statistično značilnega vpliva ni pokazal N-A3B, medtem ko A3B, A1, mut-A3A in mut-A3B retrotranspozicijo močno pospešijo;
- ➔ stopnja retrotranspozicije elementa LINE-1 je mnogo višja kot aktivnost ZfL2;
- ➔ divji tip proteinov APOBEC v relativnem smislu učinkoviteje inhibira ZfL2 kot pa LINE-1;
- ➔ mutante proteinov A3A in A3B bolj pospešijo retrotranspozicijo elementa ZfL2 kot pa elementa LINE-1;
- ➔ proteina A3A in A3B za uspešno inhibicijo retrotranspozicije potrebujeta ne samo prisotno, temveč tudi intaktno citidin deaminazno domeno.

6 POVZETEK

Retrotranspozoni so mobilni genetski elementi, ki kodirajo encime, potrebne za lastno prepisovanje in vgrajevanje v genom v procesu, imenovanem retrotranspozicija. Hkrati imajo tudi promotorsko regijo, ki se lahko aktivira pod stresnimi pogoji. Pri človeku predstavljajo skoraj polovico genoma, najbolj številna skupina pa so dolgi razpršeni jedrni elementi oz. retrotranspozoni LINE. Ker povzročajo naključne genetske preuređitve tako v somatskih kot tudi spolnih in embrionalnih celicah, so pogosto vzrok različnim genetskim boleznim. Tekom evolucije so se pod vplivom močnega pozitivnega selekcijskega pritiska temu ustrezeno razvili proteini A3, ki poleg retrovirusom, preprečujejo oz. upočasnujejo razmnoževanje tudi retrotranspozonom. Proteini A3 sodijo v encimsko družino citidinskih deaminaz. Retrovirusom onemogočijo razmnoževanje tako, da v reverznem transkriptu virusne nukleinske kisline pretvarjajo citozin v uracil, kar vodi v nastanek mutacij iz gyanina v adenin v kodirajoči molekuli DNA virusa. Sprva se je enak mehanizem predvideval tudi pri inhibiciji retrotranspozicije, kasneje pa se je izkazalo, da encimska aktivnost ni nujno potrebna za inhibicijo retrotranspozicije.

V okviru diplomskega dela smo preverili vpliv intaktnih proteinov A3 in proteina A1 ter vpliv mutiranih A3A in A3B na retrotranspozicijo elementov LINE-1 in ZfL2. Hitrost retrotranspozicije smo primerjali v celicah HeLa z uporabo označenega retrotranspozona v prisotnosti posameznih proteinov APOBEC. V predhodnih raziskavah je že bilo ugotovljeno, da proteini APOBEC ne inhibirajo retrotranspozicije elementov LINE-1 in ZfL2 po mehanizmu deaminacije citozina v uracil. Zato je bil naš namen preveriti, ali je encimsko aktivna domena kljub temu potrebna oz. če je kljub temu potrebna intaktna katalitična regija te domene. Najprej smo pripravili ustrezne mutante ter jih poleg intaktnih proteinov vsakega posebej transficirali v sesalske celice 293T. Lizate celic smo v nadaljevanju analizirali s poliakrilamidno elektroforezo in s prenosom po Westernu preverili ekspresijo. Nato smo v celice vnesli zapis za posamezen protein A3 skupaj z zapisom za označen retrotranspozon in spremljali inhibitorne učinke posameznega proteina na retrotranspozicijo. Inhibitorni vpliv na retrotranspozicijo elementa LINE-1 so pokazali A3A, A3F in A3G, nobenega vpliva niso pokazali A3B, N-A3B in A3C, medtem ko sta

mA3 in A1 retrotranspozicijo pospešila – prvi rahlo, drugi pa zelo močno. V primeru retrotranspozona ZfL2 so bili inhibitorni A3A, A3G, A3F, A3C in mA3, močna pospešitev aktivnosti pa je bila opažena pri mut-A3A, A3B, mut-A3B in A1. LINE-1 je v primerjavi z ZfL2 v vseh pogledih mnogo aktivnejši.

V nadaljnih raziskavah bi lahko preverili vpliv več različnih kombinacij proteinov APOBEC hkrati na retrotranspozicijo elementov LINE-1 in LINE-2. Pri tem bi najprej poskusili uporabiti tiste proteine, za katere je že znano, da najbolje inhibirajo retrotranspozicijo. Raziskave je potrebno nadaljevati tudi v smeri odkritja mehanizma inhibicije retrotranspozicije, po katerem delujejo proteini APOBEC na LINE-1 in LINE-2. To bi vodilo v bolje splošno razumevanje dinamike mobilnih genetskih elementov ter možnost razvoja rekombinantnih proteinov za zdravljenje nekaterih genetskih bolezni, ki jih povzročajo elementi LINE. Zanimivo bi bilo izvedeti tudi, zakaj nekatere mutante retrotranspozicijo znatno pospešijo. Ali je vpliv neposreden, preko fizičnega stika molekul? Ali mutante vplivajo posredno, preko katere celici lastne molekule? Ali je vpliv bolj kompleksen, in mutante spremenijo enega ali več celičnih procesov? Poskusi z različnimi tipi mutant in pri različnih pogojih bi nedvomno pomagali razumeti mehanizem pozitivnega vpliva na stopnjo retrotranspozicije.

7 LITERATURA

- [1] Teng B., Burant C.F., Davidson, N.O. 1993. **Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein.** Science, 260: 1816-1819
 - [2] Wedekind J.E., Dance G.S., Sowden M.P., Smith, H.C. 2003. **MessengerRNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business.** Trends Genet., 19: 207–216
 - [3] Smith H.C., Bottaro A., Sowden M.P., Wedekind J.E. 2004. **Activation-induced deaminase: the importance of being specific.** Trends Genet., 20: 224–227
 - [4] Huthoff H., Malim M.H. 2005. **Cytidine deamination and resistance to retroviral infection: towards a structural understanding of the APOBEC proteins.** Virology, 334: 147–153
 - [5] Bennett R.P., Diner E., Sowden M.P., Lees J.A., Wedekind J.E., Smith H.C. 2006. **APOBEC-1 and AID are nucleo-cytoplasmic trafficking proteins but APOBEC3G cannot traffic.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 350: 214–219
 - [6] Wedekind J.E., Gillilan R., Janda A., Krucinska J., Salter J.D., Bennett R.P., Raina J., Smith H.C. 2006. **Nanostructures of APOBEC3G support a hierarchical assembly model of high molecular mass ribonucleoprotein particles from dimeric subunits.** J. Biol. Chem., 281: 38122–38126
 - [7] Lehmann D.M., Galloway C.A., MacElrevey C., Sowden M.P., Wedekind J.E., Smith H.C. 2007. **Functional characterization of APOBEC-1 complementation factor phosphorylation sites.** Biochim. Biophys. Acta, 1773: 408–418
 - [8] Lee G.S., Brandt V.L., Roth D.B. 2004. **B cell development leads off with a base hit: dU:dG mismatches in class switching and hypermutation.** Mol Cell, 16: 505–508
 - [9] Mills R.E., Bennett E.A., Iskow R.C., Devine S.E. 2007. **Which transposable elements are active in human genome?** Trends in genetics, vol.23, No. 4: 183–191
 - [10] Harris R.S., Sale J.E., Petersen-Mahrt S.K., Neuberger M.S. 2002. **AID is essential for immunoglobulin V gene conversion in a cultured B cell line.** Curr. Biol., 12: 435–438
-

- [11] Eto T., Kinoshita K., Yoshikawa K., Muramatsu M., Honjo T. 2003. **RNA-editing cytidine deaminase APOBEC-1 is unable to induce somatic hypermutation in mammalian cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100: 12895–12898
- [12] Rada C., Di Noia J.M., Neuberger M.S. 2004. **Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation.** Mol. Cell, 16: 163–171
- [13] Di Noia J.M. in Neuberger M.S. 2007. **Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation.** Annu. Rev. Biochem., 76: 1–22
- [14] Di Noia J.M., Williams G.T., Chan D.T., Buerstedde J.M., Baldwin G.S., Neuberger M.S. 2007. **Dependence of antibody gene diversification on uracil excision.** J. Exp. Med., 204: 3209–3219
- [15] Liao W., Hong S.H., Chan B.H., Rudolph F.B., Clark S.C., Chan L. 1999. **APOBEC-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 260: 398–404
- [16] Matsumoto T., Marusawa H., Endo Y., Ueda Y., Matsumoto Y., Chiba T. 2006. **Expression of APOBEC2 is transcriptionally regulated by NF-kappaB in human hepatocytes.** FEBS Lett., 580: 731–735
- [17] Prochnow C., Bransteitter R., Klein M.G., Goodman M.F., Chen X.S. 2007. **The APOBEC-2 crystal structure and functional implications for the deaminase AID.** Nature, 445: 447–451
- [18] Rogozin I.B., Basu M.K., Jordan I.K., Pavlov Y.I., Koonin E.V. 2005. **APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis.** Cell Cycle, 4: 1281–1285
- [19] Boeke J.D. 1997. **LINEs and Alus – the polyA connection.** Nat. Genet., 16: 6–7
- [20] Bogerd H.P., Wiegand H.L., Doeble B.P., Lueders K.K., Cullen B.R. 2006. **APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells.** Nucl. Acids Res., 34: 89–95
-

- [21] Bogerd H.P., Wiegand H.L., Hulme A.E., Garcia-Perez J.L., O'Shea K.S., Moran J.V., Cullen B.R. 2006. **Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103: 8780–8785
- [22] Esnault C., Millet J., Schwartz O., Heidmann T. 2006. **Dual inhibitory effects of APOBEC family proteins on retrotransposition of mammalian endogenous retroviruses.** Nucl. Acids Res., 34: 1522–1531
- [23] Muckenfuss H., Hamdorf M., Held U., Perkovic M., Lower J., Cichutek K., Flory E., Schumann G.G., Munk C. 2006. **APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition.** J. Biol. Chem., 281: 22161–22172
- [24] Stenglein M.D., Harris R.S. 2006. **APOBEC3B and APOBEC3F inhibit L1 retrotransposition by a DNA deamination-independent mechanism.** J. Biol. Chem., 281: 16837–16841
- [25] Sheehy A.M., Gaddis N.C., Choi J.D., Malim M.H. 2002. **Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein.** Nature, 418: 646–650
- [26] Hill M.S., Mulcahy E.R., Gomez M.L., Pacyniak E., Berman N.E., Stephens E.B. 2006. **APOBEC3G expression is restricted to neurons in the brains of pigtailed macaques.** AIDS Res. Hum. Retroviruses, 22: 541–550
- [27] Peng G., Lei K.J., Jin W., Greenwell-Wild T., Wahl S.M. 2006. **Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity.** J. Exp. Med., 203: 41–46
- [28] Pido-Lopez J., Whittall T., Wang Y., Bergmeier L.A., Babaahmady K., Singh M., Lehner T. 2007. **Stimulation of cell surface CCR5 and CD40 molecules by their ligands or by HSP70 up-regulates APOBEC3G expression in CD4(+) T cells and dendritic cells.** J. Immunol., 178: 1671–1679
- [29] Stopak K.S., Chiu Y.L., Kropp J., Grant R.M., Greene W.C. 2007. **Distinct patterns of cytokine regulation of APOBEC3G expression and activity in primary lymphocytes, macrophages, and dendritic cells.** J. Biol. Chem., 282: 3539–3546
- [30] Ying S., Zhang X., Sarkis P.T., Xu R., Yu X. 2007. **Cell-specific regulation of APOBEC3F**
-

- by interferons.** Acta Biochim. Biophys. Sin., (Shanghai) 39: 297–304
- [31] Peng G., Greenwell-Wild T., Nares S., Jin W., Lei K.J., Rangel Z.G., Munson P.J., Wahl S.M. 2007. **Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression.** Blood, 110: 393–400
- [32] Jarmuz A., Chester A., Bayliss J., Gisbourne J., Dunham I., Scott J., Navaratnam N. 2002. **An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22.** Genomics, 79: 285–296
- [33] Harris R.S., Liddament M.T. 2004. **Retroviral restriction by APOBEC proteins.** Nat. Rev. Immunol., 4: 868–877
- [34] Aguiar R.S., Peterlin B.M. 2008. **APOBEC3 proteins and reverse transcription.** Virus research, 134: 74-85
- [35] Sawyer S.L., Emerman M., Malik H.S. 2004. **Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G.** PLoS Biol., 2: E275
- [36] Conticello S.G., Thomas C.J., Petersen-Mahrt S.K., Neuberger M.S. 2005. **Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases.** Mol. Biol. Evol., 22: 367–377
- [37] Franca R., Spadari S., Maga G. 2006. **APOBEC deaminases as cellular antiviral factors: a novel natural host defense mechanism.** Med. Sci. Monit., 12: RA92–RA98
- [38] Bogerd H.P., Wiegand H.L., Doeble B.P., Cullen B.R. 2007. **The intrinsic antiretroviral factor APOBEC3B contains two enzymatically active cytidine deaminase domains.** Virology, 364: 486–493.
- [39] Dang Y., Wang X., Esselman W.J., Zheng Y.H. 2006. **Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family.** J. Virol., 80: 10522–10533
- [40] Aires da Silva F., Santa-Marta M., Freitas-Vieira A., Mascarenhas P., Barahona I., Moniz-Pereira J., Gabuzda D., Goncalves J. 2004. **Camelized rabbit-derived VH single-domain intrabodies against Vif strongly neutralize HIV-1 infectivity.** J. Mol. Biol., 340: 525–542
-

- [41] Alce T.M., Popik W. 2004. **APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein.** J. Biol. Chem., 279: 34083–34086
- [42] Luo K., Liu B., Xiao Z., Yu Y., Yu X., Gorelick R., Yu X.F. 2004. **Amino-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human APOBEC3G packaging.** J. Virol., 78: 11841–11852
- [43] Svarovskaia, E.S., Xu H., Mbisa J.L., Barr R., Gorelick R.J., Ono A., Freed E.O., Hu W.S., Pathak V.K. 2004. **Human apolipoprotein BmRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs.** J. Biol. Chem., 279: 35822–35828
- [44] Mangeat B., Turelli P., Caron G., Friedli M., Perrin L., Trono D. 2003. **Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts.** Nature, 424: 99–103
- [45] Iwatani Y., Chan D.S., Wang F., Maynard K.S., Sugiura W., Gronenborn A.M., Rouzina I., Williams M.C., Musier-Forsyth K., Levin J.G. 2007. **Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G.** Nucl. Acids Res., 35: 7096–7108
- [46] Bishop K.N., Holmes R.K., Malim M.H. 2006. **Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination.** J. Virol., 80: 8450–8458
- [47] Holmes R.K., Koning F.A., Bishop K.N., Malim M.H. 2007. **APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G.** J. Biol. Chem., 282: 2587–2595
- [48] Luo K., Wang T., Liu B., Tian C., Xiao Z., Kappes J., Yu X.F. 2007. **Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation.** J. Virol., 81: 7238–7248
- [49] Arts E.J., Wainberg M.A. 1996. **Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and early events in reverse transcription.** Adv. Virus Res., 46: 97–163
- [50] Paillart J.C., Marquet R., Skripkin E., Ehresmann C., Ehresmann B. 1996. **Dimerization of retroviral genomic RNAs: structural and functional implications.** Biochimie, 78:
-

- 639–653
- [51] Zheng Y.H., Peterlin B.M. 2005. **Intracellular immunity to HIV-1: newly defined retroviral battles inside infected cells.** Retrovirology, 2: 23-29
- [52] Chiu Y.L., Greene W.C. 2006. **Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases.** Trends in immunology, vol. 27, issue 6: 291-297
- [53] Yu Q., Konig R., Pillai S., Chiles K., Kearney M., Palmer S., Richman D., Coffin J.M., Landau N.R. 2004. **Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome.** Nat. Struct. Mol. Biol., 11: 435–442
- [54] Chelico L., Pham P., Calabrese P., Goodman M.F. 2006. **APOBEC3G DNA deaminase acts processively 3' →5' on single-stranded DNA.** Nat. Struct. Mol. Biol., 13: 392-399
- [55] Schrofelbauer B., Yu Q., Zeitlin S.G., Landau N.R. 2005. **Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases.** J. Virol., 79: 10978–10987
- [56] Kaiser S.M., Emerman M. 2006. **Uracil DNA glycosylase is dispensable for human immunodeficiency virus type 1 replication and does not contribute to the antiviral effects of the cytidine deaminase APOBEC3G.** J. Virol., 80: 875–882
- [57] Yu X., Yu Y., Liu B., Luo K., Kong W., Mao P., Yu X.F. 2003. **Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex.** Science, 302: 1056–1060
- [58] Liu B., Yu X., Luo K., Yu Y., Yu X.F. 2004. **Influence of primate lentiviral Vif and proteasome inhibitors on human immunodeficiency virus type 1 virion packaging of APOBEC3G.** J. Virol., 78: 2072–2081
- [59] Mehle A., Strack B., Ancuta P., Zhang C., McPike M., Gabuzda D. 2004. **Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway.** J. Biol. Chem., 279; 7792–7798
- [60] Liu B., Sarkis P.T., Luo K., Yu Y., Yu X.F. 2005. **Regulation of APOBEC3F and human immunodeficiency virus type 1 Vif by Vif-Cul5-ElonB/C E3 ubiquitin ligase.** J. Virol., 79: 9579–9587
- [61] Malim M.H. 2006. **Natural resistance to HIV infection: the Vif-APOBEC interaction.** C.
-

R. Biol., 329 871–875

- [62] Mehle A., Thomas E.R., Rajendran K.S., Gabuzda D. 2006. **A zinc-binding region in Vif binds Cul5 and determines cullin selection.** J. Biol. Chem., 281: 17259–17265
 - [63] Shirakawa K., Takaori-Kondo A., Kobayashi M., Tomonaga M., Izumi T., Fukunaga K., Sasada A., Abudu A., Miyauchi Y., Akari H., Iwai K., Uchiyama T. 2006. **Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex.** Virology, 344: 263–266
 - [64] Xiao Z., Ehrlich E., Yu Y., Luo K., Wang T., Tian C., Yu X.F. 2006. **Assembly of HIV-1 Vif-Cul5 E3 ubiquitin ligase through a novel zinc-binding domain-stabilized hydrophobic interface in Vif.** Virology, 349: 290–299
 - [65] Mangeat B., Turelli P., Liao S., Trono D. 2004. **A single amino acid determinant governs the species-specific sensitivity of APOBEC3G to Vif action.** J. Biol. Chem., 279: 14481–14483
 - [66] Xu H., Svarovskaia E.S., Barr R., Zhang Y., Khan M.A., Strebel K., Pathak V.K. 2004. **A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factorinduced depletion.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101: 5652–5657
 - [67] Navarro F., Bollman B., Chen H., Konig R., Yu Q., Chiles K., Landau N.R. 2005. **Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G.** Virology, 333: 374–386
 - [68] Mehle A., Wilson H., Zhang C., Brazier A.J., McPike M., Pery E., Gabuzda D. 2007. **Identification of an APOBEC3G binding site in HIV-1 Vif and inhibitors of Vif-APOBEC3G binding.** J. Virol., 81: 13235–13241
 - [69] Xiao Z., Ehrlich E., Luo K., Xiong Y., Yu X.F. 2007. **Zinc chelation inhibits HIV Vif activity and liberates antiviral function of the cytidine deaminase APOBEC3G.** FASEB J., 21: 217–222
 - [70] Bogerd H.P., Doeble B.P., Wiegand H.L., Cullen B.R. 2004. **A single amino acid difference in the host APOBEC3G protein controls the primate speciesspecificity of HIV type 1 virion infectivity factor.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101: 3770–3774
-

- [71] Schrofelbauer B., Chen D., Landau N.R. 2004. **A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif).** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101: 3927–3932
- [72] Bishop K.N., Holmes R.K., Sheehy A.M., Davidson N.O., Cho S.J., Malim M.H. 2004. **Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins.** Curr. Biol., 14: 1392–1396
- [73] Liddament M.T., Brown W.L., Schumacher A.J., Harris R.S. 2004. **APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo.** Curr. Biol., 14: 1385–1391
- [74] Zheng Y.H., Irwin D., Kurosu T., Tokunaga K., Sata T., Peterlin B.M. 2004. **Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication.** J. Virol., 78: 6073–6076
- [75] Rose K.M., Marin M., Kozak S.L., Kabat D. 2005. **Regulated production and anti-HIV type 1 activities of cytidine deaminases APOBEC3B, 3F, and 3G.** AIDS Res. Hum. Retroviruses, 21: 611–619
- [76] Stopak K. et al. 2003. **HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability.** Mol. Cell., 12: 591–601
- [77] Yu Q., Chen D., Konig R., Mariani R., Unutmaz D., Landau N.R. 2004. **APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication.** J. Biol. Chem., 279: 53379–53386
- [78] Madani N., Kabat D. 2000. **Cellular and viral specificities of human immunodeficiency virus type 1 vif protein.** J. Virol., 74: 5982–5987
- [79] 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. 2003. **DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection.** Cell, 113: 803–809
- [80] Doeble B.P., Schafer A., Wiegand H.L., Bogerd H.P., Cullen B.R. 2005. **Differential sensitivity of murine leukemia virus to APOBEC3-mediated inhibition is governed by virion exclusion.** J. Virol., 79: 8201–8207
-

- [81] Abudu A., Takaori-Kondo A., Izumi T., Shirakawa K., Kobayashi M., Sasada A., Fukunaga K., Uchiyama T. 2006. **Murine retrovirus escapes from murine APOBEC3 via two distinct novel mechanisms.** Curr. Biol., 16: 1565–1570
- [82] Okeoma C.M., Lovsin N., Peterlin B.M., Ross S.R. 2007. **APOBEC3 inhibits mouse mammary tumour virus replication in vivo.** Nature, 445: 927–930
- [83] Jost S., Turelli P., Mangeat B., Protzer U., Trono D. 2007. **Induction of antiviral cytidine deaminases does not explain the inhibition of hepatitis B virus replication by interferons.** J. Virol., 81: 10588–10596
- [84] Nguyen D.H., Gummuluru S., Hu J. 2007. **Deamination-independent inhibition of hepatitis B virus reverse transcription by APOBEC3G.** J. Virol., 81: 4465–4472
- [85] Xu R., Zhang X., Zhang W., Fang Y., Zheng S., Yu X.F. 2007. **Association of human APOBEC3 cytidine deaminases with the generation of hepatitis virus B × antigen mutants and hepatocellular carcinoma.** Hepatology, 46: 1810–1820
- [86] Zhang W., Zhang X., Tian C., Wang T., Sarkis P.T., Fang Y., Zheng S., Yu X.F., Xu R. 2007. **Cytidine deaminase APOBEC3B interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and suppresses hepatitis B virus expression.** Cell Microbiol., 10: 112–121
- [87] Mahieux R., Suspene R., Delebecque F., Henry M., Schwartz O., Wain-Hobson S., Vartanian J.P., 2005. **Extensive editing of a small fraction of human T-cell leukemia virus type 1 genomes by four APOBEC3 cytidine deaminases.** J. Gen. Virol., 86: 2489–2494
- [88] Sasada A., Takaori-Kondo A., Shirakawa K., Kobayashi M., Abudu A., Hishizawa M., Imada K., Tanaka Y., Uchiyama T. 2005. **APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1.** Retrovirology, 2: 32
- [89] Kazazian H.H.(Jr.) in Moran J.V. 1998. **The impact of L1 retrotransposons on the human genome.** Nat. Genet., 19: 19–24
- [90] Kazazian H.H.(Jr.) 2000. **L1 retrotransposons shape the mammalian genome.** Science, 289: 1152–1153
-

- [91] Prak E.T. in Kazazian Jr. H.H. 2000. **Mobile elements and the human genome.** Nat. Rev. Genet., 1: 134–144
- [92] Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J.P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann N., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Graffham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J.C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Showe R., Sims S., Waterston R.H., Wilson R.K., Hillier L.W., McPherson J.D., Marra M.A., Mardis E.R., Fulton L.A., Chinwalla A.T., Pepin K.H., Gish W.R., Chissoe S.L., Wendl M.C., Delehaunty K.D., Miner T.L., Delehaunty A., Kramer J.B., Cook L.L., Fulton R.S., Johnson D.L., Minx P.J., Clifton S.W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J.F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M. 2001. **Initial sequencing and analysis of the human genome.** Nature, 409: 860–921
- [93] Kazazian Jr. H.H. in Goodier J.L. 2002. **LINE drive retrotransposition and genome instability.** Cell, 110: 277–280
- [94] Deininger P.L., Moran J.V., Batzer M.A., Kazazian Jr. H.H. 2003. **Mobile elements and mammalian genome evolution.** Curr. Opin. Genet. Dev., 13: 651–658
- [95] Kazazian Jr. H.H. 2004. **Mobile elements: drivers of genome evolution.** Science, 303: 1626–1632
- [96] Holmes R.K., Malim M.H., Bishop K.N. 2007. **APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing?** Trends Biochem. Sci., 32: 118–128
- [97] Kolosha V.O., Martin S.L. 1997. **In vitro properties of the first ORF protein from mouse LINE-1 support its role in ribonucleoprotein particle formation during retrotransposition.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94: 10155–10160
-

- [98] Sassaman D.M., Dombroski B.A., Moran J.V., Kimberland M.L., Naas T.P., DeBerardinis R.J., Gabriel A., Swergold G.D., Kazazian Jr. H.H. 1997. **Many human L1 elements are capable of retrotransposition.** Nat. Genet., 16: 37–43
- [99] Brouha B., Schustak J., Badge R.M., Lutz-Prigge S., Farley A.H., Moran J.V., Kazazian Jr. H.H. 2003. **Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100: 5280–5285
- [100] Kolosha V.O., Martin S.L. 2003. **High-affinity, non-sequence-specific RNA binding by the open reading frame 1 (ORF1) protein from long interspersed nuclear element 1 (LINE-1).** J. Biol. Chem., 278: 8112–8117
- [101] Schumann G.G. 2007. **APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition.** Biochem. Soc. Trans., 35: 637–642
- [102] Chen H., Lilley C.E., Yu Q., Lee D.V., Chou J., Narvaiza I., Landau N.R., Weitzman M.D. 2006. **APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons.** Curr. Biol., 16: 480–485
- [103] Honjo T., Nagaoka H., Shinkura R. and Muramatsu M. 2005. **AID to overcome the limitations of genomic information.** Nature Immunol., 6: 655–661
- [104] Dewannieux M. and Heidmann T. 2005. **LINEs, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modeling.** Cytogenet. Genome Res., 110: 35–48
- [105] de Parseval N. and Heidmann T. 2005. **Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes.** Cytogenet. Genome Res., 110: 318–332
- [106] Burden A.F., Manley N.C., Clark A.D., Gartler S.M., Laird C.D. and Hansen R.S. 2005. **Hemimethylation and non-CpG methylation levels in a promoter region of human LINE-1 (L1) repeated elements.** J. Biol. Chem., 280: 14413–14419
- [107] Bourc'his D. in Bestor T.H. 2004. **Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L.** Nature, 18: 18
- [108] Kalmykova A.I., Klenov M.S. in Gvozdev V.A. 2005. **Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the Drosophila male germline.** Nucleic Acids Res., 33: 2052–2059
-

- [109] Soifer H.S., Zaragoza A., Peyvan M., Behlke M.A., Rossi J.J. 2005. **A potential role for RNA interference in controlling the activity of the human LINE-1 retrotransposon.** Nucleic Acids Res., 33: 846–856
- [110] Ketting R.F. in Plasterk R.H. 2000. **A genetic link between co-suppression and RNA interference in C.elegans.** Nature, 404: 296–298
- [111] Tabara H., Sarkissian M., Kelly W.G., Fleenor J., Grishok A., Timmons L., Fire A., Mello, C.C. 1999. **The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in C.elegans.** Cell, 99: 123–132
- [112] Jensen S., Gassama M.P., Heidmann T. 1999. **Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing.** Nature Genet., 21: 209–212
- [113] Jensen S., Gassama M.P., Heidmann, T. 1999. **Cosuppression of I transposon activity in Drosophila by I-containing sense and antisense transgenes.** Genetics, 153: 1767–1774
- [114] Esnault C., Heidmann O., Delebecque F., Dewannieux M., Ribet D., Hance A.J., Heidmann T., Schwartz, O. 2005. **APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses.** Nature, 433: 430–433
- [115] Dutko J.A., Schafer A., Kenny A.E., Cullen B.R., Curcio M.J. 2005. **Inhibition of a yeast LTR retrotransposon by human APOBEC3 cytidine deaminases.** Curr. Biol., 15: 661–666
- [116] Schumacher A.J., Nissley D.V., Harris, R.S. 2005. **APOBEC3G hypermutates genomic DNA and inhibits Ty1 retrotransposition in yeast.** Proc. Natl Acad. Sci. USA, 6: 6
- [117] Cordaux R. et al. 2006. **Estimating the retrotransposition rate of human Alu elements.** Gene, 373: 134–137
- [118] Yu Q. et al. 2004. **Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome.** Nat. Struct. Mol. Biol., 11: 435–442
- [119] Sakai K. et al. 2006. **The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell-cycle arrest.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 103: 3369–3374
-

- [120] Langlois M.A. et al. 2005. **Mutational comparison of the single-domained APOBEC3C and double-domained APOBEC3F/G antiretroviral cytidine deaminases provides insight into their DNA target site specificities.** Nucleic Acids Res., 33: 1913–1923
 - [121] Hache G. et al. 2005. **The retroviral hypermutation specificity of APOBEC3F and APOBEC3G is governed by the C-terminal DNA cytosine deaminase domain.** J. Biol. Chem., 280: 10920–10924
 - [122] Li X. et al. 2001. **Frequency of recent retrotransposition events in the human factor IX gene.** Hum. Mutat., 17: 511–519
 - [123] Zhang H. et al. 2003. **The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA.** Nature, 424: 94–98
 - [124] Wiegand H.L. et al. 2004. **A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins.** EMBO J., 23: 2451–2458
 - [125] Kobayashi M., Takaori-Kondo A., Shindo K., Abudu A., Fukunaga K., Uchiyama T. 2004. **APOBEC3G targets specific virus species.** J. Virol., 78: 8238–8244
 - [126] Rose K.M. et al. 2004. **Transcriptional regulation of APOBEC3G, a cytidine deaminase that hypermutates human immunodeficiency virus.** J. Biol. Chem., 279: 41744–41749
 - [127] Doeble B.P. et al. 2005. **Human APOBEC3B is a potent inhibitor of HIV-1 infectivity and is resistant to HIV-1 Vif.** Virology, 339: 281–288
 - [128] Cen S. et al. 2004. **The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G.** J. Biol. Chem., 279: 33177–33184
 - [129] Cullen B.R. 2006. **Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors.** J. Virol., 80: 1067–1076
 - [130] Mangeat B. in Trono D. 2005. **Lentiviral vectors and antiretroviral intrinsic immunity.** Hum. Gene Ther., 16: 913–920
 - [131] Turelli P. in Trono D. 2005. **Editing at the crossroad of innate and adaptive immunity.** Science, 307: 1061–1065
 - [132] Stopak K. in Greene W.C. 2005. **Protecting APOBEC3G: a potential new target for HIV drug discovery.** Curr. Opin. Investig. Drugs, 6: 141–147
-

- [133] Kazazian H.H. 1999. **An estimated frequency of endogenous insertional mutations in humans.** Nat. Genet., 22: 130
 - [134] Britten R.J. in Kohn D.E. 1968. **Repeated sequences in DNA.** Science, 161: 529–540
 - [135] Wallace M.R. et al. 1991. **A de novo Alu insertion results in neurofibromatosis type 1.** Nature, 353: 864–866
 - [136] Kazazian H.H. Jr. et al. 1988. **Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man.** Nature, 332: 164–166
 - [137] Ostertag E.M. in Kazazian H.H., Jr. 2001. **Biology of mammalian L1 retrotransposons.** Annu. Rev. Genet., 35: 501–538
 - [138] Mathias S.L. et al. 1991. **Reverse transcriptase encoded by a human transposable element.** Science, 254: 1808–1810
 - [139] Chiu Y.L., Greene W.C. 2008. **The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements.** Annual Review of Immunology, 26: 317-353
 - [140] Luan D. et al. 1993. **Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition.** Cell, 72: 595–605
 - [141] Hulme A.E. et al. 2006. **Selective inhibition of Alu retrotransposition by APOBEC3G.** Gene, 390 (1-2): 199–205
 - [142] Turelli P. et al. 2004. **The innate antiretroviral factor APOBEC3G does not affect human LINE-1 retrotransposition in a cell culture assay.** J. Biol. Chem., 279: 43371–43373
 - [143] Cost G.J. et al. 2002. **Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro.** EMBO J., 21: 5899–5910
 - [144] Lovšin N. 2003. **Molekularna evolucija non-LTR retrotranspozonov pri vretenčarjih.** Doktorska disertacija, Medicinska fakulteta, Ljubljana
 - [145] International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. **Initial sequencing and analysis of the human genome.** Nature, 409: 860-921
-

- [146] Suganoa T., Kajikawaa M., Okada N. 2006. **Isolation and characterization of retrotransposition-competent LINEs from zebrafish.** Gene, 365: 74-82
- [147] Kajikawa M., Okada N. 2002. **LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence.** Cell, 111 (3): 433-44
- [148] Kapitonov V.V., Jurka J. 2002. **CR1-1_DR, a family of CR1-like non-LTR retrotransposons in zebrafish.** Repbase Reports, 2 (4), 6: 74-82
- [149] Ostertag E.M., Madison B.B., Kano H. 2007. **Mutagenesis in rodents using the L1 retrotransposon.** Genome Biology, 8 (Suppl 1): S16
- [150] Bestor T.H. 2005. **Transposons reanimated in mice.** Cell, 122 (3): 322-325
- [151] Abbott A. 2004. **Laboratory animals: The Renaissance rat.** Nature 428: 464-466
- [152] Carlson C.M., Dupuy A.J., Fritz S., Roberg-Perez K.J., Fletcher C.F., Largaespada D.A. 2003. **Transposon Mutagenesis of the Mouse Germline.** Genetics 165: 243-256
- [153] 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. 2002. **A Comprehensive Analysis of recently integrated human Ta L1 elements.** The American Journal of Human Genetics, 71 (2): 312-326
- [154] Chiu Y.L., Witkowska H.E., Hall S.C., Santiago M., Soros V.B., Esnault C., Heidmann T., Greene W.C. 2006. **High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103: 15588–15593
- [155] Kinomoto M., Kanno T., Shimura M., Ishizaka Y., Kojima A., Kurata T., Sata T., Tokunaga K. 2007. **All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition.** Nucleic Acid Research, 35 (9): 2955-2964
- [156] John Wiley and Sons, Inc. 2004. **Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture; Basic protocol: Trypsinizing and subculturing cells from a monolayer; Support protocol 1: Freezing human cells grown in monolayer cultures; Support protocol 2: Freezing cells grown in suspension culture; 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; 1 (1.1)
-

- [157] Kuhelj R., Renko M., Bevec T., Dolinar M., Gunčar G., Ivanovski G., Jerala R., Lovšin N., Župunski V. 2003. **Biokemija v praksi: načela in tehnike.** 3. izdaja, Ljubljana
- [158] QIAGEN. 2006. **QIAprep® Miniprep Handbook for Purification of Molecular Biology Grade DNA.** Second edition: 21.
- [159] Roche Applied Sciences. 2007. **Fugene 6 Transfection reagent: For the transient and stable transfection of animal cells.** Version November 2007
- [160] Stratagene. 2007. **QuikChange® II-E Site-Directed Mutagenesis Kit.** Instruction manual, revision B
- [161] Podergajs N. 2009. **Vpliv proteinov APOBEC3 na retrotranspozicijo LINE-2 retrotranspozonov.** Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
- [162] Moran J.V., Holmes S. E., Naas T. P., DeBerardinis R. J., Boeke J. D., Kazazian H. H. Jr. 1996. **High Frequency Retrotransposition in Cultured Mammalian Cells.** Cell, 87: 917-927
- [163] Mikl M.C., Watt I.N., Lu M., Reik W., Davies S.L., Neuberger M.S., Rada C. 2005. **Mice deficient in APOBEC2 and APOBEC3.** Mol. Cell Biol. 25, 7270-7277
- [164] MacDuff D.A., Demorest Z.L., Harris R.S. 2009. **Aid can restrict L1 retrotransposition suggesting a dual role in innate and adaptive immunity.** Nucleic Acids Res. 37(6), 1854-1867
- [165] Wicker T., Sabot F., Hua-Van A., Bennetzen J.L., Capy P., Chalhoub B., Flavell A., Leroy P., Morgante M., Panaud O., Paux E., SanMiguel P., Schulman A.H. 2007. **A unified classification system for eukaryotic transposable elements.** Nat. Rev. Genet. 8(12), 973-82
- [166] Llorens C., Fares M.A., Moya A. 2008. **Relationships of gag-pol diversity between Ty3/Gypsy and Retroviridae LTR retroelements and the three kings hypothesis.** BMC Evol Biol. 8(8), 276
- [167] <http://www.bioinformatics.org/wikiposon/doku.php?id=classification:class:class>
-

- [168] Petit V., Guetard D., Renard M., Keriel A., Sitbon M., Wain-Hobson S., Vartanian J. P. 2008. **Murine APOBEC1 is a powerful mutator of retroviral and cellular RNA in vitro and in vivo.** Journal of Molecular Biology, 385, 65-78
- [169] Ikeda T., Ohsugi T., Kimura T., Matsushita S., Maeda Y., Harada S., Koito A. 2008. **The antiretroviral potency of APOBEC1 deaminase from small animal species.** Nucleic Acids Res, 36, 6859-71
- [170] Cervantes Gonzales M., Suspene R., Henry M., Guetard D., Wain-Hobson S., Vartanian J. P. 2009. **Human APOBEC1 cytidine deaminase edits HBV DNA.** Retrovirology, 6, 96-101

ZAHVALA

Največja zahvala gre moji somentorici dr. Niki Lovšin, ki me je tekom eksperimentalnega dela strokovno vodila ter mi z vzpodbudami in nasveti pomagala razumeti, kaj pomeni raziskovalno delo. Zahvaljujem se ji za čas in energijo, ki mi jo je posvetila ter za vse nasvete, pripombe in usluge, ki jih je zame storila.

Močno se zahvaljujem dr. Veri Župunski, ki me je v času odsotnosti somentorice vodila in mi pomagala.

Zahvalo izrekam mentorju doc. dr. Dušanu Kordišu za kritičen pregled diplomske naloge in za vse nasvete in predloge.

Zahvaljujem se vsem na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti Inštituta Jožef Stefan za vso pomoč in potrpljenje pri mojem delu.

Zahvalo izrekam Neži Podergajs, ki mi je s pomembnimi podatki olajšala izdelavo diplomske naloge.

Hvala recenzentki za pregled diplome in koristne nasvete ter predsedniku za korektno izpeljan postopek zagovora.

Iskrena hvala staršem za vso materialno in nematerialno pomoč, tako v času opravljanja diplomske naloge, kot tudi tekom celotnega študija. Brez nje bi mi bilo mnogo, mnogo težje.