

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Nataša LINDIČ

**PROTIVIRUSNI PROTEINI APOBEC3 IN NJIHOVA VLOGA PRI
INHIBICIJI RETROTRANSPOZICIJE
RETROTRANSPOZONA LINE2**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ANTIVIRAL APOBEC3 PROTEINS AND THEIR ROLE IN
RETROTRANSPOSITION INHIBITION
OF RETROTRANSPOSON LINE2**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Katedri za biokemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 7.12.2011 kandidatka izpolnjuje pogoje za neposredni prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja genetike. Za mentorja je bil imenovan izr. prof. dr. Marko Dolinar.

Mentor: izr. prof. dr. Marko DOLINAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Simon HORVAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Radovan KOMEL
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Član: izr. prof. dr. Marko DOLINAR
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za biokemijo

Datum zagovora: 14.3.2014

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem besedilu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Doktorandka:
Nataša Lindič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	577.21:577.112(043.3)=163.6
KG	genetika/proteini/APOBEC3/genom/inhibicija/encimska aktivnost/retrovirusi/retrotranspozoni/citidin deaminaze/hipermutacije/DNA/retrotranspozicija
AV	LINDIČ, Nataša, univ. dipl. mikrobiologinja
SA	DOLINAR, Marko (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje Genetika
LI	2014
IN	PROTIVIRUSNI PROTEINI APOBEC3 IN NJIHOVA VLOGA PRI INHIBICIJI RETROTRANSPOZICIJE RETROTRANSPOZONA LINE2
TD	Doktorska disertacija
OP	XI, 98 str., 8 pregl., 32 sl., 292 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Proteini AID/APOBEC so citidin deaminaze, ki v okviru prirojene imunosti ščitijo celico pred škodljivimi učinki retrovirusov in retrotranspozonov. Encimsko delovanje proteinov APOBEC3 (A3), ki so prisotni le pri sesalcih, se odraža v hipermutacijah v nukleotidnih zaporedjih sesalskih retroelementov. Proteini AID/APOBEC so sicer prisotni pri vseh vretenčarjih, njihov vpliv na evolucijo genomov in mehanizmi njihovega delovanja pa so slabo raziskani. V naši raziskavi smo s pomočjo genomske analize odkrili odtise citidin deaminazne aktivnosti že v vretenčarskih genomih prednikov sesalcev, in sicer v elementih LINE v genomu zelenega kuščarja anoli, pri katerem je bil odkrit trenutno najstarejši znani protein APOBEC1 (A1). Kuščarjev protein A1 je pokazal visoko deaminazno aktivnost in učinkovito delovanje proti retroelementom. Primerjava delovanja kuščarjevega in človeškega proteina A1 je razkrila, da je mehanizem inhibicije različnih elementov LINE evolucijsko ohranjen in odvisen od prisotnosti retrotranspozonskega proteina ORF1, ter da ne vključuje vpliva na stabilnost ali sintezo novih kopij retrotranspozonske DNA. Nasprotno pa so humani proteini A3 zmanjšali relativno število novih kopij retrotranspozona, njihovo delovanje proti elementom LINE pa je bilo neodvisno od prisotnosti proteina ORF1, nukleotidnega zaporedja retrotranspozona in njihove encimske aktivnosti. Razlike, ki smo jih opazili v mehanizmu delovanja vretenčarskih proteinov AID/APOBEC proti elementom LINE, sovpadajo z razlikami v pogostosti hipermutacij pri elementih LINE v vretenčarskih genomih in nakazujejo pomembno vlogo proteinov AID/APOBEC v evoluciji vretenčarskih genomov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dd
DC	577.21:577.112(043.3)=163.6
CX	genetics/proteins/APOBEC3/genome/inhibition/enzymatic activity/retroviruses/retrotransposons/cytidine deaminases/hypermutations/DNA/retrotransposition
AU	LINDIČ, Nataša
AA	DOLINAR, Marko (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences; Field: Genetics
PY	2014
TI	ANTIVIRAL APOBEC3 PROTEINS AND THEIR ROLE IN RETROTRANSPOSITION INHIBITION OF RETROTRANSPOSON LINE2
DT	Doctoral dissertation
NO	XI, 98 p., 8 tab., 32 fig., 292 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	AID/APOBEC proteins are cytidine deaminases, which act within the innate immune response to protect the genome against the harmful effects of retroviruses and retrotransposons. The protective cytidine deaminase activity of mammalian APOBEC3 (A3) proteins is evident from clusters of hypermutations present in retroelements of mammalian genomes. AID/APOBEC proteins are present throughout the vertebrate lineage and their impact on genome evolution and the mechanisms of their activity are not clear. In our study, we found the first evidence of cytidine deaminase activity in non-mammalian vertebrates. Mutations were found in LINE elements in the green anole lizard genome, where the oldest known APOBEC1 (A1) protein was discovered. We confirmed that the lizard A1 protein is a potent cytidine deaminase and an inhibitor of retrotransposition. A comparative analysis of the anti-retroelement activity of lizard and human A1 proteins showed that the mechanism of A1-induced LINE inhibition is evolutionary conserved, is dependent on the retrotransposon-encoded ORF1 protein, and does not affect the stability or synthesis of novel retrotransposon DNA. In contrast, the human A3 proteins acted in a sequence-, enzymatic activity- and ORF1 protein-independent manner to inhibit LINE retrotransposition by decreasing the relative number of novel copies of retrotransposon DNA. Our data strongly suggest that the inhibitory mechanisms of A1 and A3 proteins against LINE elements differ, which coincides with the differential editing of LINE retrotransposons detected in vertebrate genomes, showing a clear impact of AID/APOBEC proteins on the evolution of vertebrate genomes.

KAZALO VSEBINE

str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TRANSPOZICIJSKI ELEMENTI	3
2.1.1 DNA-transpozoni.....	3
2.1.2 RNA-transpozoni (retrotranspozoni)	3
2.1.2.1 LTR-retrotranspozoni	4
2.1.2.2 Ne-LTR-retrotranspozoni	5
2.1.2.2.1 Retrotranspozoni SINE	5
2.1.2.2.2 Retrotranspozoni LINE	5
2.1.2.2.2.1 Element LINE1 (L1)	6
2.1.2.2.2.2 Elementi LINE2 (L2)	8
2.1.3 Izražanje retroelementov in učinki retrotranspozicije na gostitelja.....	8
2.1.4 Evolucija elementov LINE.....	9
2.1.5 Gostiteljevi zaščitni mehanizmi proti delovanju retroelementov.....	10
2.2 DRUŽINA PROTEINOV AID/APOBEC	10
2.2.1 Izvor in evolucija proteinov AID/APOBEC	10
2.2.2 Značilnosti strukture proteinov AID/APOBEC	11
2.2.3 Funkcija proteinov AID/APOBEC	13
2.2.3.1 Protein AID/APOBEC in inhibicija retrovirusov	13
2.2.3.2 Proteini AID/APOBEC in inhibicija retrotranspozonov	15
2.2.3.3 Proteini AID/APOBEC in metabolizem RNA	16
2.2.4 Protein AID	16
2.2.5 Protein A1	17
2.2.6 Protein A2	18
2.2.7 Proteini A3	18
2.2.7.1 Protein A3A	18
2.2.7.2 Protein A3B	19
2.2.7.3 Protein A3C	20
2.2.7.4 Protein A3D	20
2.2.7.5 Proteina A3F in A3G	20
2.2.7.6 Protein A3H	21
2.2.8 Protein A4	22
2.2.9 Protein A5	22
3 MATERIAL IN METODE.....	23
3.1 PLAZMIDNA DNA	23

3.1.1	Plazmidi z zapisi za retrotranspozone	23
3.1.2	Plazmidi z zapisi za proteine AID/APOBEC	24
3.1.2.1	Priprava plazmidov z zapisi za proteine AID/APOBEC	24
3.1.2.1.1	Restriktivno kloniranje.....	24
3.1.2.1.2	Usmerjena mutageneza	27
3.1.2.1.3	Tehnologija kloniranja Gateway	28
3.1.3	Namnoževanje in izolacija plazmidne DNA	29
3.1.3.1	Bakterijski sevi <i>E. coli</i>	29
3.1.3.2	Bakterijska gojišča	29
3.1.3.3	Izolacija plazmidne DNA iz prekonočnih kultur <i>E. coli</i>	29
3.1.3.4	Trajne kulture bakterijskih celic.....	30
3.2	IN VITRO EKSPERIMENTI NA SESALSKEM MODELU	30
3.2.1	Uporabljene sesalske celice	30
3.2.1.1	Gojenje, presajanje in vzdrževanje človeških celičnih kultur HeLa in HEK293T	30
3.2.1.2	Prehodna transfekcija človeških celičnih kultur HeLa in HEK293T	31
3.2.2	Imunološko potrjevanje izražanja zapisov za proteine po prenosu western.....	31
3.2.3	Testiranje učinkov proteinov AID/APOBEC na retrotranspozone	32
3.2.3.1	Test retrotranspozicije <i>in vitro</i>	33
3.2.3.2	Izolacija celične DNA in analiza novih kopij DNA retrotranspozonov L2 in L1	34
3.2.3.3	Določanje relativnega števila novih kopij DNA retrotranspozonov L2 in L1	34
3.2.3.4	Določanje vpliva proteinov AID/APOBEC na relativno število kopij plazmidne DNA.....	35
3.2.3.5	Analiza nukleotidnih zaporedij novih kopij DNA retrotranspozonov L2 in L1	36
3.2.3.6	Izolacija in analiza RNA retrotranspozonov L2 in L1.....	37
3.2.4	Epifluorescenčna mikroskopija.....	37
3.2.5	Priprava celic HeLa za analizo interakcij med proteini hA3 in RNA z metodo prečnega povezovanja in koimunoprecipitacije (CLIP)	38
4	REZULTATI	39
4.1	GENOMSKA ANALIZA NESESALSKIH VRETENČARSKIH GENOMOV	39
4.2	TEST MUTAGENOSTI S PROTEINI AID/APOBEC	41
4.3	VPLIV PROTEINOV AID/APOBEC NA UČINKOVITOST RETROTRANSPOZICIJE	42
4.3.1	Učinkovitost retrotranspozicije elementov ZfL2-2, hL1, ZfL2-1 in UnaL2 v celicah HeLa	42
4.3.2	Učinek proteinov AID/APOBEC iz ribe cebrice na retrotranspozicijo elementov ZfL2-2, hL1 in ZfL2-1	43
4.3.3	Učinek kuščarjevega proteina A1 na retrotranspozicijo elementa hL1 in ZfL2-2	44
4.3.4	Učinek humanega in kuščarjevega proteina A1 na retrotranspozon ZfL2-1, ki zapisuje za ORF1p	45
4.3.5	Učinek humanih proteinov A3 na retrotranspozicijo elementa ZfL2-2	46
4.3.6	Pomen ohranjenega aktivnega mesta proteina hA3A za inhibicijo retrotranspozona ZfL2-2	49
4.3.7	Pomen encimske aktivnosti humanega proteina hA3B za inhibicijo retrotranspozona ZfL2-2	51
4.4	VPLIV PROTEINOV AID/APOBEC NA RELATIVNO ŠTEVILU NOVIH KOPIJ RETROTRANSPOZONSKE DNA IN RNA	52
4.4.1	Vpliv proteinov hA3 na relativno število novih kopij DNA retrotranspozona ZfL2-2	52
4.4.1.1	Vpliv proteinov hA3 na relativno število kopij plazmidne DNA	54
4.4.1.2	Vpliv proteinov hA3 na relativno število kopij retrotranspozonske RNA	55

4.4.2	Vpliv kuščarjevih in ribjih proteinov APOBEC na relativno število novih kopij DNA retrotranspozonov ZfL2-2 in hL1	56
4.4.2.1	Vpliv proteinov A1 na relativno število kopij plazmidne DNA.....	57
4.4.2.2	Vpliv proteinov A1 na relativno število kopij retrotranspozonske RNA	57
4.5	VPLIV PROTEINOV AID/APOBEC NA NUKLEOTIDNA ZAPOREDJA NOVIH KOPIJ DNA RETROTRANSPOZONOV ZfL2-2 IN hL1	58
4.6	ANALIZA INTERAKCIJ MED PROTEINI A3 IN RNA V CELICI	60
4.6.1	Potrjevanje izražanja in funkcionalnosti konstrukta hA3AGFP.....	60
4.6.2	Identifikacija RNA-vezavnih partnerjev proteina hA3A v celici.....	61
5	RAZPRAVA	63
5.1	PRISOTNOSTI HIPERMUTACIJ G V A V NESESALSKIH GENOMIH.....	63
5.2	INHIBITORNA AKTIVNOST PROTEINOV A1 PROTI RETROELEMENTOM IZVIRA PRI AMNIONTIH	66
5.3	MEHANIZEM DELOVANJA PROTEINOV A1 IN A3 PROTI RETROTRANSPOZONOM LINE SE RAZLIKUJE	67
5.3.1	Vpliv prisotnosti retrotranspozonskega proteina ORF1p na delovanje proteinov A1 in A3	67
5.3.2	Vpliv lastnosti retrotranspozonov LINE na delovanje proteinov A3	69
5.3.2.1	Pomen encimske aktivnosti proteinov A3 za inhibicijo retrotranspozona ZfL2-2	69
5.3.2.2	Vpliv proteinov A3 in A1 na relativno število novih kopij retrotranspozonske DNA	71
5.3.2.3	Vpliv proteinov A3 in A1 na nukleotidna zaporedja novih kopij retrotranspozonske DNA	72
5.4	PROTEINI A3 IN VEZAVA RNA	73
6	SKLEPI	75
7	POVZETEK (SUMMARY).....	77
7.1	POVZETEK	77
7.2	SUMMARY	78
8	VIRI.....	80
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Seznam začetnih oligonukleotidov, uporabljenih pri restrikcijskem kloniranju.....	27
Preglednica 2: Seznam začetnih oligonukleotidov, uporabljenih pri usmerjeni mutagenezi.....	28
Preglednica 3: Seznam začetnih oligonukleotidov, uporabljenih pri kloniranju s tehnologijo Gateway.....	29
Preglednica 4: Seznam protiteles, uporabljenih v naši raziskavi.....	32
Preglednica 5: Pogoji reakcije qPCR.....	35
Preglednica 6: Seznam začetnih oligonukleotidov za določanje relativnega števila novih kopij retrotranspozonske DNA s qPCR	35
Preglednica 7: Seznam začetnih oligonukleotidov za določanje relativnega števila kopij plazmidne DNA s qPCR.....	36
Preglednica 8: Seznam začetnih oligonukleotidov za določanje relativnega števila kopij retrotranspozonske RNA s qPCR.....	37

KAZALO SLIK

str.	
Slika 1: Shematski prikaz zgradbe glavnih skupin retroelementov (Deininger in sod., 2003)	4
Slika 2: Model mehanizma retrotranspozicije elementov LINE (Chiu in Greene, 2008).....	6
Slika 3: Shematski prikaz humanega elementa L1 (Chiu in Greene, 2008)	7
Slika 4: Shematski prikaz elementov L2 iz ribe cebrice (Sugano in sod., 2006).....	8
Slika 5: Predlagan mehanizem deaminacije citozina s citidin deaminazami (Harris in Liddament, 2004).	11
Slika 6: Shema organizacije domen humanih proteinov AID/APOBEC z ohranjenim skupnim zaporedjem (Chiu in Greene, 2008; Conticello, 2008)	12
Slika 7: Struktura C-končne katalitične domene proteina A3G (Chen in sod., 2008)	13
Slika 8: Model mehanizma inhibicije virusa HIV-1 s proteini A3 (Malim, 2009)	14
Slika 9: Model mehanizma inhibicije retrotranspozicije elementov LINE s proteini A3 (Han, 2010).....	15
Slika 10: Shematski prikaz sesalskega ekspresijskega plazmida pCEP4 z zapisom za retrotranspozon (Moran in sod., 1996)	23
Slika 11: Karta ekspresijskega vektorja pcDNA6.2 s poliklonским mestom (pcDNA6.2/myc-His, 2010)....	25
Slika 12: Potek eksperimentov	32
Slika 13: <i>In silico</i> genomska analiza retroelementov v genomih zelenega kuščarja anoli (AC), ribe cebrice (DR), in miši	40
Slika 14: Testiranje mutagenosti različnih proteinov AID/APOBEC v bakteriji <i>E. coli</i>	41
Slika 15: Prikaz rezultatov testiranja učinkovitosti retrotranspozicije z genom <i>neo</i> označenih retrotranspozonov v celicah HeLa	42
Slika 16: Učinek proteinov AID/APOBEC iz ribe cebrice na retrotranspozicijo retrotranspozonov ZfL2-2, hL1 in ZfL2-1 v celicah HeLa.....	43
Slika 17: Učinek kuščarjevih in humanega proteina A1 na retrotranspozicijo retrotranspozonov ZfL2-2 in hL1	45
Slika 18: Učinek kuščarjevih in humanega proteina A1 na retrotranspozicijo retrotranspozona ZfL2-1 (vsebuje ORF1p) v celicah HeLa	46
Slika 19: Učinek proteinov A3 na retrotranspozicijo ribjih retrotranspozonov ZfL2-2 in UnaL2	47
Slika 20: Učinek humanih proteinov hA2, hAID, hA3D in hA3H-L na retrotranspozicijo elementa ZfL2-2	48
Slika 21: Učinek mutacij v skupnem zaporedju enodomenskega proteina hA3A na njegovo sposobnost inhibicije retrotranspozona ZfL2-2	50
Slika 22: Učinek mutacij v skupnih zaporedjih dvodomenskega proteina hA3B na njegovo sposobnost inhibicije retrotranspozona ZfL2-2	52
Slika 23: Učinek proteinov A3 na relativno število novih kopij DNA retrotranspozona ZfL2-2 v celicah HeLa.....	53
Slika 24: Vpliv proteinov hA3 na relativno število kopij plazmidne DNA.....	54
Slika 25: Vpliv proteinov hA3 na relativno število kopij retrotranspozonske RNA	55
Slika 26: Učinek ribjih in kuščarjevih proteinov APOBEC na relativno število novih kopij DNA retrotranspozona ZfL2-2 ali hL1 v celicah HeLa	56
Slika 27: Vpliv proteinov A1 na relativno število kopij plazmidne DNA.....	57
Slika 28: Vpliv proteinov A1 na relativno število kopij hL1 RNA	58
Slika 29: Učinek proteinov AID/APOBEC na zaporedja novih kopij DNA elementov ZfL2-2 in hL1	59
Slika 30: Potrjevanje izražanja in funkcionalnosti konstrukta hA3AGFP.....	61
Slika 31: Preučevanje sposobnosti proteina hA3AGFP za vezavo RNA z metodo CLIP	62
Slika 32: Filogenetski prikaz odnosov med različnimi proteini AID/APOBEC in retrotranspozonskimi družinami LINE pri vretenčarjih.....	65

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°C	stopinje Celzija
A	adenin
A1	protein APOBEC1
A2	protein APOBEC2
A3	protein APOBEC3
A4	protein APOBEC4
A5	protein APOBEC5
ADAR	adenozin deaminaze, ki delujejo na RNA
AGE	agarozna gelska elektroforeza
AID	aktivacijsko inducirana citidin deaminaza (angl. activation-induced cytidine deaminase); uradni simbol AICDA
APOBEC	katalitičnemu polipeptidu podoben encim, ki preureja mRNA apolipoproteina B
bp	bazni par
C	citidin
CDA	citidin deaminazna aktivnost
cDNA	komplementarna DNA
CLIP	metoda prečnega povezovanja in imunoprecipitacije
Da	Dalton, enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa ¹² C
DMEM	osnovno gojišče za celične kulture
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNaza I	deoksiribonukleaza I
EN	endonukleaza
FBS	serum govejega zarodka
G	gvanin
GFP	zeleni fluorescenčni protein
HBB	gen za hemoglobin beta
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti
HRP	hrenova peroksidaza
kb	1000 baznih parov
kDa	1000 Daltonov
L1	retrotranspozon LINE1
L2	retrotranspozon LINE2
LB	Luria-Bertanijevgo gojišče
LDL	lipoprotein nizke gostote
LINE	dolg razpršen jedrni element
LTR	dolga končna ponovitev

M	molarnost, mol/l
mRNA	informacijska RNA
NaCl	natrijev klorid
NaDS PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
<i>neo</i>	gen za odpornost proti neomicinu
NP-40	vrsta neionskega detergenta
ORF	odprt bralni okvir
ORF1p	retrotranspozonski protein ORF1
ORF2p	retrotranspozonski protein ORF2
PABP	proteini, ki vežejo poli-A-rep mRNA
PBS	fosfatni pufer z NaCl
PCR	verižna reakcija s polimerazo
<i>PGK</i>	gen za fosfoglicerat kinazo (angl. protein kinase, cGMP-dependent, type I); uradni simbol <i>PRKG1</i>
qPCR	kvantitativni PCR v realnem času
RNA	ribonukleinska kislina
RNaza	ribonukleaza
RNP	ribonukleoproteinski delec
RT	reverzna transkriptaza
RT-PCR	reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo
SINE	kratki razpršeni jedrni elementi
<i>SOD2</i>	gen za superoksid-dismutazo 2
T	timin
TPRT	reverzna transkripcija na mestu integracije
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometan
Triton X-100	vrsta neionskega detergenta
tRNA	transportna RNA
Tween	vrsta anionskega detergenta
U	uridin
UTR	neprevajajoča se regija
Vif	pomožni protein virusa HIV
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid

1 UVOD

Retroelementi so mobilna zaporedja DNA, ki se lahko prenašajo po ali med genomi in so pomembno vplivala na evolucijo evkariontskih genomov (Kazazian, 2004; Cordaux in Batzer, 2009). Predstavljajo skoraj polovico človeškega genoma (Lander in sod., 2001) in vključujejo retroviruse, retrotranspozone z dolgimi končnimi ponovitvami (angl. long terminal repeat (LTR)) in retrotranspozone brez dolgih končnih ponovitev (ne-LTR-retrotranspozone) (Kazazian, 2004). Retroelementi se po genomu premikajo s procesom imenovanim retrotranspozicija, ki vključuje citoplazemske intermediate RNA, reverzno transkripcijo iz RNA v DNA in integracijo nove kopije DNA v genom (Cost in sod., 2002). Ker je proces retrotranspozicije za gostitelja lahko škodljiv, so se tekom evolucije razvili učinkoviti zaščitni mehanizmi za vzdrževanje stabilnosti genoma. V večini somatskih celic so retrotranspozoni utišani z metilacijo (Yoder in sod., 1997), v spolnih celicah in med embriogenezo pa z RNA-interferenco (RNAi) (Kanellopoulou in sod., 2005), mehanizmi piRNA (Malone in Hannon, 2009) ter preurejanjem DNA/RNA s proteini AID/APOBEC (Chiu in Greene, 2008). Proteini AID/APOBEC so se v evoluciji pojavili z razvojem pridobljenega imunskega sistema pri ribah in se nato razširili po celotni liniji vretenčarjev (Conticello in sod., 2005). So citidin deaminaze, ki lahko s pomočjo ohranjene cinkove domene deaminirajo citozin v uracil v zaporedjih RNA in/ali DNA (Harris in Liddament, 2004). Odtisi njihovega delovanja so prisotni v sesalskih genomih v obliki skupkov hipermutacij gvanina v adenin v nukleotidnih zaporedjih DNA različnih retrotranspozonov in retrovirusov (Esnault in sod., 2008; Carmi in sod., 2011). Proteini APOBEC3 (A3), ki so prisotni samo pri sesalcih, inhibirajo številne retro- in druge viruse, zavirajo pa tudi retrotranspozicijo endogenih LTR- in ne-LTR-retrotranspozonov, vključno z retrotranspozonom LINE1 (L1) (Chiu in Greene, 2008), ki predstavlja kar 17 odstotkov človeškega genoma (Lander in sod., 2001). Natančen mehanizem delovanja proteinov AID/APOBEC še ni znan, velja pa, da njihova encimska aktivnost ni potrebna za inhibicijo retrotranspozicije elementa L1 (Bogerd in sod., 2006b; Stenglein in Harris, 2006). Dosedanje raziskave proteinov AID/APOBEC temeljijo predvsem na testu retrotranspozicije humanega elementa L1 (hL1) v celičnih kulturah (Moran in sod., 1996). Test so razvili tudi za retrotranspozon LINE2 (L2) (Sugano in sod., 2006), ki je močno razširjen v genomih organizmov pred placentalnimi sesalci, kasneje pa vertikalno inaktiviran (Lander in sod., 2001; Lovšin in sod., 2001; Kordiš, 2009; Novick in sod., 2009). Ali in na kakšen način proteini AID/APOBEC inhibirajo elemente L2, še ni bilo določeno. Čeprav je točno mesto delovanja proteinov AID/APOBEC še neznano, pa njihova inhibitorna aktivnost ni odvisna od lokacije v celici, saj na element L1 inhibitorno delujejo tako citoplazemski kot tudi jedrni proteini AID/APOBEC, kar nakazuje, da lahko vplivajo tako na retrotranspozonske ribonukleoproteinske delce, ki nastajajo v citoplazmi, kot tudi na reverzno transkripcijo in integracijo retrotranspozona, ki poteka v jedru (Bogerd in sod., 2006b; Muckenfuss in sod., 2006). Ker se proteini AID/APOBEC vežejo tako na različne retrotranspozonske RNA (Niewiadomska in sod., 2007; Horn in sod.,

2013), kot tudi na majhne nekodirajoče RNA, vpletene v metabolizem RNA (Gallois-Montbrun in sod., 2008), je za njihovo inhibitorno delovanje proti retroelementom verjetno potrebna interakcija z RNA.

1.1 NAMEN IN HIPOTEZE

Z boljšim razumevanjem mehanizma delovanja različnih vretenčarskih proteinov AID/APOBEC smo želeli v naši raziskavi dobiti jasnejši vpogled v njihovo fiziološko in evolucijsko vlogo. Zapisi za proteine AID/APOBEC so prisotni že v nesesalskih genomih. V slednjih njihova fiziološka vloga sicer večinoma še ni znana, predvidevali pa smo, da se je aktivnost proteinov AID/APOBEC proti retroelementom razvila že pred pojavom sesalcev, kar smo preverili z analizo nesesalskih vretenčarskih genomov, ter spremljanjem učinka nesesalskih proteinov AID/APOBEC na retrotranspozicijo elementov LINE s testom retrotranspozicije in analizo nukleotidnih zaporedij novih kopij DNA retrotranspozonov. S podobnim pristopom smo preverili tudi, ali je delovanje proteinov A3 proti različnim retrotranspozonom evolucijsko ohranljeno, oziroma, ali inhibirajo tudi naš modelni retrotranspozon L2. Glede na to, da natančen mehanizem njihovega delovanja še ni znan, je bil naš namen pojasniti vlogo encimske aktivnosti proteinov A3 pri inhibiciji retrotranspozicije in identificirati molekule RNA, ki so njihovi vezavni partnerji v celici. V skladu z glavnim namenom smo v okviru doktorske disertacije preverjali naslednje delovne hipoteze:

1. Proteini APOBEC3 inhibirajo retrotranspozicijo modelnega retrotranspozona L2 iz ribe cebrice.

Predvidevali smo, da so se proteini A3 razvili za obrambo proti endogenim mobilnim genetskim retroelementom. Če to drži, bi morali inhibirati različne retrotranspozone, vključno z našim modelnim ne-LTR-retrotranspozonom L2. To hipotezo smo preverili s pomočjo *in vitro* retrotranspozicijskega testa v celičnih kulturah in analizo na novo integriranih kopij retrotranspozona v genomu.

2. Inhibitorno delovanje proteinov APOBEC3 na retrotranspozicijo retrotranspozona L2 je lahko neodvisno od njihove encimske aktivnosti.

To hipotezo smo preverili s pomočjo *in vitro* testa retrotranspozicije na encimsko neaktivnih mutantah in z zaznavanjem deaminiranih citozinov v nukleotidnem zaporedju na novo integriranih kopij retrotranspozona v genomu.

3. Med procesom inhibicije retrotranspozicije L2 pride do vezave med proteini APOBEC3 in RNA.

Vezavo in njeno mesto v celici smo želeli potrditi z identifikacijo molekul RNA, vezanih na proteine A3, izoliranih iz jedrnih ali citoplazemskih frakcij.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TRANSPOZICIJSKI ELEMENTI

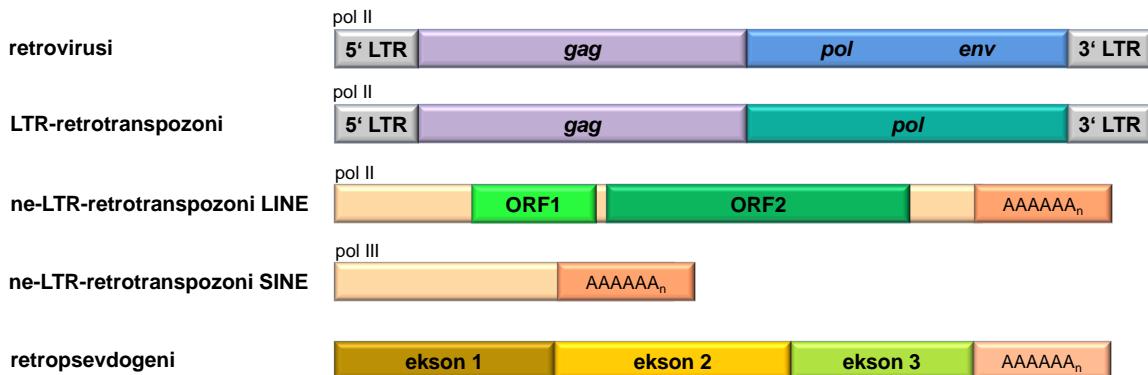
Transpozicijski elementi so mobilna nukleotidna zaporedja DNA, ki se lahko premikajo po ali celo med genomi (Goodier in Kazazian, 2008), in predstavljajo eno glavnih gonil evolucije evkariontskih genomov (Kazazian, 2004). Z insercijami, delecijami in preurejanji DNA namreč lahko vplivajo na uravnavanje transkripcije in translacije kodirajočih delov gostiteljevega genoma in predstavljajo vir nukleotidnih zaporedij za razvoj novih proteinov, njihovi proteini pa lahko mobilizirajo gostitelju lastne molekule mRNA (Feschotte, 2008). Najdemo jih pri vseh organizmih, tako pri prokariontih kot pri evkariontih, pogosto v zelo velikem obsegu v genomu. Pri človeku tako predstavljajo skoraj polovico genoma (Lander in sod., 2001). Transpozicijski elementi se po ali med genomi premikajo s procesom, imenovanim transpozicija, in se glede na mehanizem transpozicije delijo na DNA- in RNA-transpozone.

2.1.1 DNA-transpozoni

DNA-transpozoni se po genomu običajno premikajo z mehanizmom izrezovanja in ponovnega vstavljanja v genom (angl. cut and paste). Encim transpozaza, ki ga kodirajo DNA-transpozoni, prepozna in na mestu končnih obrnjenih ponovitev (angl. terminal inverted repeat (TIR)) izreže nukleotidno zaporedje transpozona in ga vgradi na novo mesto v genomu (Kapitonov in Jurka, 2001; Pritham in sod., 2007). Zaradi svojega nereplikativnega mehanizma DNA-transpozoni predstavljajo samo 2,8 odstotkov človeškega genoma (Lander in sod., 2001). Za svojo mobilnost ne potrebujejo dejavnikov gostiteljske celice, zato jih pogosto uporabljajo v transgenezi in insercijski mutagenezi (Feschotte in sod., 2002; Feschotte, 2008; Munoz-Lopez in Garcia-Perez, 2010).

2.1.2 RNA-transpozoni (retrotranspozoni)

RNA-transpozoni, ali tudi retrotranspozoni, se po genomu premikajo preko intermediata RNA (Xiong in Eickbush, 1990). Med retrotranspozone zaradi mehanizma transpozicije (retrotranspozicije) spadajo infektivni eksogeni retrovirusi in neinfektivni endogeni retrovirusi, retrotranspozoni, pa tudi retropseudogeni, ki nastanejo z retrotranspozicijo gostiteljeve mRNA (Deininger in sod., 2003; Kazazian, 2004). Njihova zgradba je prikazana na sliki 1 in opisana v nadaljevanju. Retrotranspozone glede na prisotnost dolgih končnih ponovitev (angl. long terminal repeat (LTR)) delimo v dva glavna razreda: LTR-retrotranspozone in ne-LTR-retrotranspozone (Goodier in Kazazian, 2008; Kapitonov in sod., 2009).



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe glavnih skupin retroelementov (Deininger in sod., 2003)

LTR, dolge končne ponovitve; *gag*, gen za skupinsko specifični antigen; *pol*, gen za reverzno transkriptazo; *env*, gen za protein ovojnice; pol II, promotor RNA-polimeraze II; ORF1, zapis za RNA-vezavni protein; ORF2, zapis za protein z aktivnostjo endonukleaze in reverzne transkriptaze; pol III, promotor RNA-polimeraze III; AAAAAA_n, poli-A-rep.

Figure 1: Schematic representation of major retroelement groups (Deininger et al., 2003)

LTR, long terminal repeat; *gag*, gene encoding group-specific antigen; *pol*, gene encoding reverse transcriptase; *env*, gene encoding envelope protein; pol II, RNA polymerase II promoter; ORF1, RNA binding protein encoding sequence; ORF2, endonuclease and reverse transcriptase encoding sequence; pol III, RNA polymerase III promoter; AAAAAA_n, poly-A tail.

2.1.2.1 LTR-retrotranspozoni

LTR-retrotranspozoni so retroelementi, katerih reverzna transkripcija poteka v citoplazmi. Tam se kot začetni oligonukelotidi uporabijo celične tRNA, ki so komplementarne regijam LTR. Za uspešno retrotranspozicijo LTR-retrotranspozoni torej potrebujejo regulatorne konce LTR s promotorskimi in terminatorskimi zaporedji, ter proteine, kodirane v genih *pol* in *gag* (slika 1). Po prepisu retrotranspozonske RNA z RNA-polimerazo II se po izvozu v citoplazmo in poliadensilaciji iz nje prevedeta dva poliproteina, Pol in Gag. Iz poliproteina Pol s posredovanjem njemu lastne proteaze nastanejo poleg same proteaze še ribonukleaza H (RNaza H), reverzna transkriptaza in integraza. Vsi ti proteini ob posredovanju proteina Gag, ki je sposoben vezave nukleinskih kislin, skupaj z retrotranspozonsko RNA tvorijo retrovirusom podobne delce. V njih na retrotranspozonski RNA poteče sinteza cDNA s posredovanjem reverzne transkriptaze. Nato RNaza H razgradi RNA, cDNA pa se zaokroži in sintetizira se druga veriga DNA. Novonastala kopija DNA retrotranspozona se prenese v jedro, kjer jo integraza vstavi v genom (Havecker in sod., 2004). LTR-elementi so še posebno pogosti pri rastlinah (Feschotte in sod., 2002; Vitte in Panaud, 2005), medtem ko pri miših predstavlja 10 odstotkov (Waterston in sod., 2002; McCarthy in McDonald, 2004), pri človeku pa neaktivnih 8 odstotkov genoma (Lander in sod., 2001). S pridobitvijo gena *env* (angl. envelope), ki kodira proteine virusne ovojnice, naj bi se iz LTR-elementov razvili infektivni eksogeni retrovirusi (Xiong in Eickbush, 1990).

2.1.2.2 Ne-LTR-retrotranspozoni

Ne-LTR-retrotranspozoni so evolucijsko starejši in številčnejši od LTR-retrotranspozonov in ne vsebujejo dolgih končnih ponovitev, njihova reverzna transkripcija pa poteka v jedru po mehanizmu TPRT (angl. target-primed reverse transcription (TPRT)) (Luan in sod., 1993). Ne-LTR-retrotranspozoni se razlikujejo po preferenci do tarč, po podvojitvah/insercijah, ki jih povzročijo na mestu integracije, pa tudi po hitrosti in natančnosti reverzne transkripcije. Razdelimo jih na neavtonomne kratke razpršene jedrne elemente SINE (angl. short interspersed nuclear elements) in avtonomne dolge razpršene jedrne elemente LINE (angl. long interspersed nuclear element) (Bohne in sod., 2008; Kapitonov in sod., 2009).

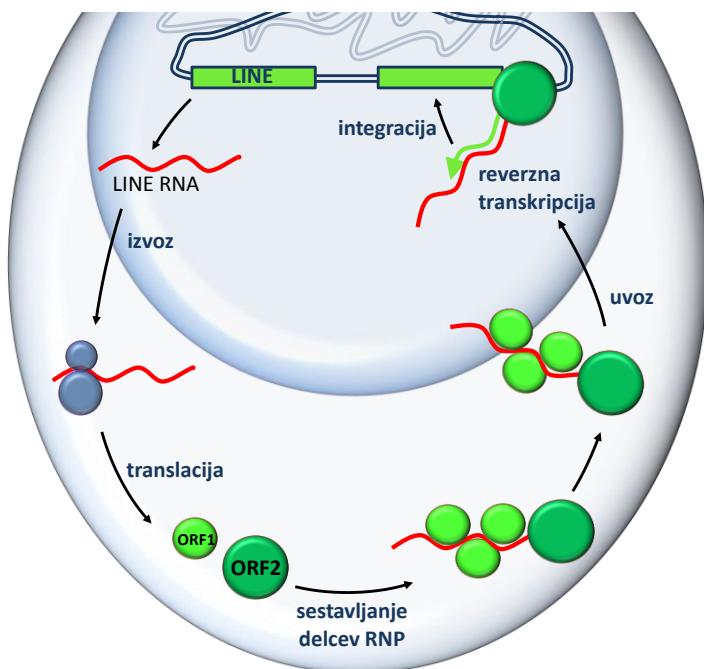
2.1.2.2.1 Retrotranspozoni SINE

Elementi SINE so nekodirajoča nukleotidna zaporedja, dolga od 50 do 300 baznih parov (bp). Izvirajo iz majhnih nekodirajočih, v translaciji vpleteneh celičnih RNA kot so tRNA, ribosomska RNA 7 S in RNA 5 S, včasih pa so v nukleotidna zaporedja elementov SINE vključeni tudi deli retrovirusnega izvora (Deininger in sod., 2003). Elemente SINE prepisuje RNA-polimeraza III. V človeškem genomu najstevilčnejši element SINE je 300 bp dolg element Alu, ki izvira iz RNA 7 S (Malik in Eickbush, 1998) in vsebuje še promotor za RNA-polimerazo III in poli-Arep, ki je nujen za uspešno retrotranspozicijo (slika 1) (Dewannieux in sod., 2003; Dewannieux in Heidmann, 2005). Enako velja za element SVA, ki je nastal v genomih hominidov z združevanjem dveh nukleotidnih zaporedij Alu, variabilnim številom tandemskih ponovitev (angl. variable number of tandem repeats (VNTR)), nukleotidnega zaporedja za protein ovojnice (*env*) in 3'-konca LTR humanega endogenega retrovirusa HERV-K10 (Raiz in sod., 2012). Retrotranspozicija neavtonomnih elementov SINE je v celoti odvisna od proteinov, ki jih kodirajo avtonomni elementi LINE (Bennett in sod., 2008a; Raiz in sod., 2012).

2.1.2.2.2 Retrotranspozoni LINE

Elementi LINE so sestavljeni iz notranjega promotorja za RNA-polimerazo II na neprevajajočem se 5'-koncu (angl. untranslated region (UTR)) (Swergold, 1990; Moran in sod., 1996; Okada in sod., 1997; Alexandrova in sod., 2012) ter enega ali dveh bralnih okvirjev (angl. open reading frame (ORF)) z zapisoma za RNA-vezavni protein ORF1 (Holmes in sod., 1992; Feng in sod., 1996; Kolosha in Martin, 2003; Nakamura in sod., 2012) in za evolucijsko zelo ohranjen protein z aktivnostjo reverzne transkriptaze in endonukleaze, protein ORF2p (Xiong in Eickbush, 1990; Mathias in sod., 1991; Moran in sod., 1996; Malik in sod., 1999; Kajikawa in Okada, 2002; Sugano in sod., 2006). Za mehanizem retrotranspozicije elementov LINE je značilna reverzna transkripcija na mestu integracije (TPRT) (Luan in sod., 1993). Proces se začne s prepisom retrotranspozonske

RNA, ki se prenese v citoplazmo, kjer se sintetizirata proteina ORF1p in ORF2p (slika 2). Oba proteina sta večinoma *cis*-preferenčna in vežeta svojo lastno RNA, da nastanejo ribonukleoproteinski delci (angl. ribonucleoprotein particle (RNP)) (Doucet in sod., 2010), ki se prenesejo nazaj v jedro. Na mestu integracije v kromosomsko DNA endonukleaza ORF2p naredi zarezo, pri čemer nastane prosta 3'-hidroksilna skupina, ki jo reverzna transkriptaza uporabi kot začetni oligonukleotid za sintezo cDNA (Luan in sod., 1993; Cost in sod., 2002). Procesa sinteze druge verige DNA retrotranspozona in njegova integracija še nista natančno raziskana, verjetno pa pri obeh procesih sodelujejo gostiteljevi proteini (Suzuki in sod., 2009; Dai in sod., 2012).



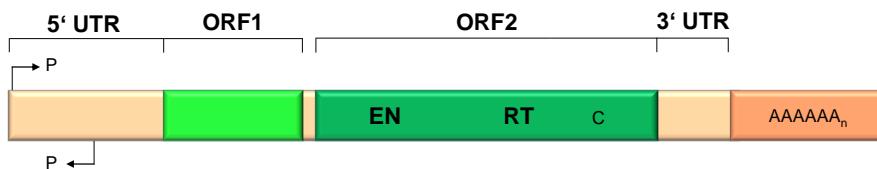
Slika 2: Model mehanizma retrotranspozicije elementov LINE (Chiu in Greene, 2008)
Figure 2: Proposed model of LINE retrotransposition mechanism (Chiu and Greene, 2008)

Zaradi zdrsa reverzne transkriptaze in prepisovanja procesirane mRNA z že dodanim poli-A-repolom imajo elementi LINE v genomu pogosto skrajšane 5'-konce in dodatna poli-A-zaporedja (Ostertag in Kazazian, 2001; Ovchinnikov in sod., 2001; Martin in sod., 2005b). Glede na podobnosti in razlike v nukleotidnem zaporedju, ki kodira reverzno transkriptazo, se elementi LINE delijo v več kladov, v človeškem genomu pa najdemo tri sorodne družine elementov LINE: LINE1, LINE2 in LINE3 (Lander in sod., 2001), od katerih je najbolj raziskan humani element LINE1 (hL1).

2.1.2.2.2.1 Element LINE1 (L1)

Element L1 predstavlja največji delež genomov sesalcev (Bohne in sod., 2008) in je edini še aktivni avtonomni element v človeškem genomu. Dolg je 6 kb (slika 3) in za uspešno transpozicijo potrebuje 2 proteina, ORF1p in ORF2p, regijo 5'-UTR s promotorjem za

RNA-polimerazo II in regijo 3'-UTR s poli-A-signalom in poli-A-repom (AAAAAA) (Doucet in sod., 2010).



Slika 3: Shematski prikaz humanega elementa L1 (Chiu in Greene, 2008)

P, promotor; EN, endonukleazna domena; RT, domena z aktivnostjo reverzne transkriptaze; C, domena, bogata s cisteini; AAAAAA_n, poli-A-rep.

Figure 3: Schematic representation of human L1 element (Chiu and Greene, 2008)

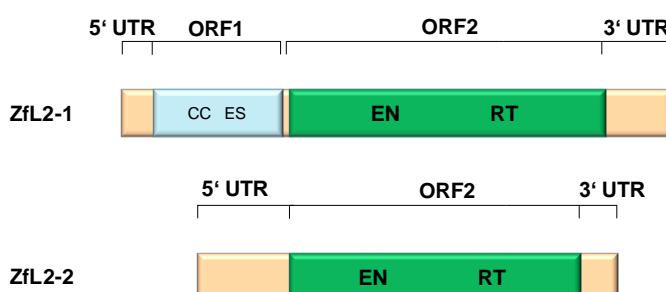
P, promoter; EN, endonuclease domain; RT, reverse transcriptase domain; C, cysteine-rich domain; AAAAAA_n, poly-A tail.

Regija 5'-UTR je dolga okoli 910 bp in poleg notranjega promotorja RNA-polimeraze II (Swergold, 1990; Alexandrova in sod., 2012) vsebuje še funkcionalna vezavna mesta za različne transkripcijske faktorje (Becker in sod., 1993; Tchenio in sod., 2000; Yang in sod., 2003; Harris in sod., 2009), protismerni promotor (Speek, 2001) ter številne alternativne promotorje (Alexandrova in sod., 2012). Protein ORF1p je 40 kDa velik protein z RNA-vezavno in šaperonsko aktivnostjo (Holmes in sod., 1992; Hohjoh in Singer, 1996; Moran in sod., 1996; Kulpa in Moran, 2005; Martin in sod., 2005a; Goodier in sod., 2007), njegova homotrimerna struktura pa nakazuje specifičnost za enoveržne substrate RNA (Khazina in sod., 2011). Humani protein ORF1p veže molekulo RNA hL1 na delu, ki zapisuje za protein ORF2p, medtem ko je mišji ORF1p nespecifičen (Hohjoh in Singer, 1996; Martin in sod., 2003; Basame in sod., 2006). Protein ORF2p elementa hL1 je 150 kDa velik protein s C-končno aktivnostjo reverzne transkriptaze, na N-koncu pa ima apurinskim/apirimidinskim endonukleazam homologno endonukleazo (EN) (Dombroski in sod., 1991; Mathias in sod., 1991; Feng in sod., 1996; Moran in sod., 1996; Cost in Boeke, 1998), ki *in vitro* specifično veže enojno verigo DNA z zaporedjem 5'-TTTT/A (Feng in sod., 1996; Cost in Boeke, 1998). Za vezavo RNA in akumulacijo proteina ORF2p v delcih RNP je ključen C-konec proteina ORF2p, ki vsebuje s cisteini bogat motiv (Fanning in Singer, 1987; Doucet in sod., 2010), medtem ko N-konec proteina ORF2p nosi signal za prenos v jedro (Goodier in sod., 2004), zaporedje na 3'-koncu zapisa za ORF2, ki vključuje še del regije 3'-UTR, pa deluje kot jedrni signal za eksport RNA (Lindtner in sod., 2002). Ker ima protein ORF2p razmeroma nizko procesivnost in pogosto ne doseže 5'-konca med sintezo prve verige (cDNA(-)), lahko nastanejo nefunkcionalni elementi L1 s krajšim 5'-koncem, ki so pogosti v genomu (Szak in sod., 2002; Han in Boeke, 2004). Konec 3'-UTR sesalskega elementa L1 ima tudi poli-A-rep (Moran in sod., 1996), ki je v določeni dolžini sicer nujen za retrotranspozicijo, saj se nanj specifično vežejo proteini PABP (angl. poly (A) binding proteins (PABP)), ki sodelujejo pri poliadenilaciji RNA, iniciaciji translacije, sestavljanju delcev RNP in stabilnosti mRNA, morda pa tudi pri translokaciji delcev L1-

RNP v gostiteljski celici (Dai in sod., 2012). Kljub temu pa regija 3'-UTR elementa L1 ni potrebna za retrotranspozicijo v celicah HeLa (Moran in sod., 1996), zato lahko proteini retrotranspozona hL1 vežejo in mobilizirajo tudi druge RNA in tako povzročajo nastanek psevdogenov (Moran in sod., 1999; Esnault in sod., 2000; Wei in sod., 2001).

2.1.2.2.2 Elementi LINE2 (L2)

Elementi L2 so bližnji sorodniki elementov L1, ki pa za razliko od elementov L1 v genomih placentalnih sesalcev niso več aktivni. Večina raziskav je bila tako narejenih na retrotranspozonyh L2 iz ribe cebrice in jegulje, za katere obstaja tudi razvit sistem za spremljanje retrotranspozicije v celičnih kulturah (Sugano in sod., 2006; Kajikawa in sod., 2012). Elementi L2 se od elementov L1 razlikujejo tudi v več strukturnih in funkcijskih lastnostih (slika 4). Za svojo retrotranspozicijo v celičnih kulturah elementi L2 ne potrebujejo vedno obeh proteinov ORF. Nekateri namreč zapisujejo za in se lahko retrotransponirajo samo s pomočjo reverzne transkriptaze in endonukleaze ORF2p (Kajikawa in Okada, 2002; Sugano in sod., 2006; Kajikawa in sod., 2012). Obstajajo pa tudi taki, ki nosijo zapis za oba proteina. Protein ORF1p, ki ga kodira element ZfL2-1 ribe cebrice, se sicer razlikuje od proteina ORF1p elementa hL1, ima namreč motiv obvite vijačnice (angl. coiled-coil (CC)) in esterazno (ES) domeno, vendar pa naj bi opravljal podobne funkcije kot protein ORF1p elementa hL1 (Kajikawa in sod., 2012). Poleg tega je za razliko od nespecifičnega proteina ORF2p L1 reverzna transkriptaza elementov L2 specifična za konec 3'-UTR svoje lastne RNA (Okada in sod., 1997; Kajikawa in Okada, 2002).



Slika 4: Shematski prikaz elementov L2 iz ribe cebrice (Sugano in sod., 2006)

CC, motiv obvite vijačnice; ES, esterazna domena; EN, endonukleazna domena; RT, domena z aktivnostjo reverzne transkriptaze.

Figure 4: Schematic representation of zebrafish L2 elements (Sugano et al., 2006)

CC, coiled-coil motif; ES, esterase domain; EN, endonuclease domain; RT, reverse transcriptase domain.

2.1.3 Izražanje retroelementov in učinki retrotranspozicije na gostitelja

Retrotranspozicija je najpogosteša v zgodnji embriogenezi (Kano in sod., 2009; Vitullo in sod., 2012), po vsej verjetnosti pa tudi nujna za razvoj zarodka (Pittoggi in sod., 2003; Beraldi in sod., 2006), kjer ustvarja somatski mozaicizem (Kano in sod., 2009).

Retrotranspozicija je povišana tudi v spolnih celicah (Georgiou in sod., 2009), v nevronskih predniških celicah (Coufal in sod., 2009), somatsko pa v nevronskih celicah (Baillie in sod., 2011) ter celicah raka dojke (Morse in sod., 1988), črevesja (Miki in sod., 1992), pljuč (Iskow in sod., 2010) in različnih epitelijskih rakov (Ting in sod., 2011). Naraste tudi ob povečanem stresu (Kalendar in sod., 2000), ob izpostavljenosti γ -sevanjem (Farkash in sod., 2006), težkim kovinam (Kale in sod., 2005) in genotoksičnim in negenotoksičnim onesnaževalcem iz okolja in hrane (Stribinskis in Ramos, 2006; Okudaira in sod., 2011; Okudaira in sod., 2012). Posledice procesa retrotranspozicije so v odvisnosti od celice in mesta insercije lahko pozitivne ali negativne. Retrotranspozoni genomsko nestabilnost povzročajo z integracijami v kodirajoče gene (Hancks in Kazazian, 2012), povzročanjem kromosomskih lomov, nepravilnih rekombinacij in izgub DNA ob rekombinaciji med dvema kopijama transpozona (Gilbert in sod., 2002; Symer in sod., 2002), ali pa z mobilizacijo in integracijo gostiteljeve RNA, ki vodi v nastajanje psevdogenov (Esnault in sod., 2000). Kljub temu pa retrotranspozoni v celici povzročajo tudi nastanek novih regulatornih mrež (Feschotte, 2008; Dunham in sod., 2012), saj vplivajo na izražanje RNA s spremjanjem alternativnega spajanja in vzorcev poliadenilacije (Cordaux in Batzer, 2009), delujejo pa tudi kot ojačevalci ali promotorji (Slotkin in Martienssen, 2007) in omogočajo tkivno specifično izražanje genov gostitelja (Matlik in sod., 2006), s premeščanjem eksonov pa tudi nastanek novih genov (Moran in sod., 1999).

2.1.4 Evolucija elementov LINE

Med evolucijo delež retroelementov v genomih narašča, vendar pa se raznolikost zmanjšuje. V genomu rib z 10-odstotnim deležem transpozicijskih elementov obstaja tudi do 20 različnih skupin retroelementov (Volff in sod., 2003). Velika raznovrstnost retroelementov z nizko stopnjo fiksacije in znaki nedavne aktivnosti je značilna tudi za genom zelenega kuščarja anoli (Novick in sod., 2009), medtem ko so v genomih sesalcev prisotni le elementi L1, L2 in L3/CR1 (Lander in sod., 2001; Bohne in sod., 2008). V mišjem genomu, kjer je delež transpozicijskih elementov 40-odstoten, je na primer aktivnih 3000 kopij elementa L1 (Goodier in sod., 2001), v človeškem, kjer je delež transpozonov 50-odstoten, pa je zaradi skrajšanja 5'-koncev ter notranjih preureditev in mutacij aktivnih in za večino retrotranspozicije odgovornih le še 80 do 100 kopij, in to kljub temu, da elementi L1 predstavljajo kar 17 odstotkov človeškega genoma (Lander in sod., 2001; Brouha in sod., 2003; Hancks in Kazazian, 2012). Med evolucijo tetrapodov se je raznolikost retrotranspozonov torej močno zmanjševala (Bohne in sod., 2008), kar lahko nakazuje na učinkovite zaščitne mehanizme gostitelja.

2.1.5 Gostiteljevi zaščitni mehanizmi proti delovanju retroelementov

Zaradi možnega destabilizacijskega delovanja retroelementov na gostiteljev genom je gostitelj razvil številne zaščitne mehanizme (Goodier in Kazazian, 2008). Izražanje retrotranspozonov je tako v gostiteljski celici na ravni transkripcije uravnano z vezavo transkripcijskih faktorjev (Tchenio in sod., 2000; Yang in sod., 2003) in epigenetsko z metilacijo histonskih repov (Martens in sod., 2005) ali citozinov v promotorskem zaporedju transpozicijskih elementov (Barlow, 1993; Athanikar in sod., 2004; Bourc'his in Bestor, 2004). Posttranskripcijsko je izražanje retroelementov uravnano z RNA-interferenco (RNAi) (Engels, 1996; Soifer in sod., 2005; Girard in sod., 2006; Vagin in sod., 2006; Watanabe in sod., 2006; Yang in Kazazian, 2006; Obbard in sod., 2009; Arjan-Odedra in sod., 2012; Goodier in sod., 2012), razgradnjo z eksonukleazo Trex1, ki razgrajuje cDNA retroelementov (Stetson in sod., 2008; Lindahl in sod., 2009), s preurejanjem retrotranspozonske RNA z encimi ADAR (Kim in sod., 2004) ter s celičnimi citidin deaminazami, proteini iz družin AID/APOBEC (Arias in sod., 2012; Koito in Ikeda, 2013).

2.2 DRUŽINA PROTEINOV AID/APOBEC

Proteini AID/APOBEC so citidin deaminaze, ki pretvarjajo citozin v uracil v nukleotidnih zaporedjih molekul RNA in/ali DNA. Pojavili so se z razvojem vretenčarjev in imunskega sistema (Conticello, 2008), vključujejo pa aktivacijsko inducirano citidin deaminazo AID (angl. activation induced cytidine deaminase; uradni simbol AICDA) in različne skupine proteinov APOBEC (katalitičnemu polipeptidu podoben encim, ki preureja mRNA apolipoproteina B; angl. apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like). Z deaminacijo svojih polinukleotidnih tarč protein AID skrbi za preklapljanje med razredi protiteles, medtem ko so proteini APOBEC vpleteni v metabolizem lipidov preko preurejanja mRNA apolipoproteina B, v inhibicijo različnih virusov in retrotranspozonov ter v epigenetsko uravnavanje izražanja genov, morda pa tudi v metabolizem RNA. Zaradi njihove citidin deaminazne aktivnosti (CDA) mora biti njihovo izražanje skrbno uravnano, sicer lahko vodi/prispeva k razvoju bolezni ali celo raka (Zheng in sod., 2012). Ne glede na številne raziskave proteinov AID/APOBEC ostaja na področju njihove vloge, uravnavanja izražanja, mehanizma delovanja in tudi njihovega vpliva na evolucijo vretenčarskih genomov še mnogo neznank.

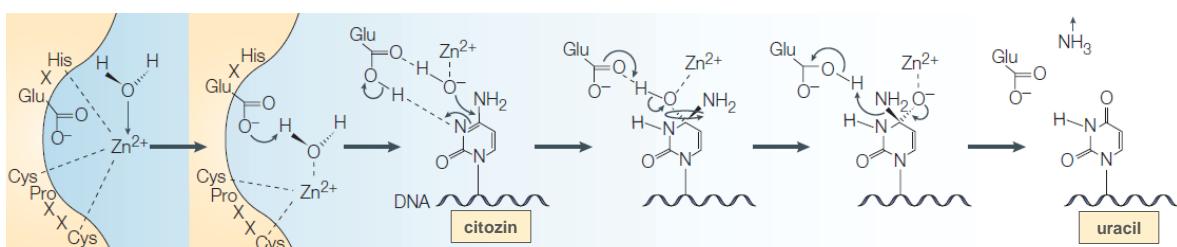
2.2.1 Izvor in evolucija proteinov AID/APOBEC

Proteini AID/APOBEC so se pojavili z razvojem vretenčarjev, izvirajo pa iz skupnega prednika: deaminaze, vpletene v preurejanje tRNA s povzročanjem mutacij A v I (Conticello, 2008). Nastali so med številnimi kompleksnimi genskimi podvojitvami in pod delovanjem pozitivne selekcije (Jarmuz in sod., 2002; Sawyer in sod., 2004). Že pri ribah

najdemo proteina AID in APOBEC2 (A2) (Conticello, 2008). Pri dvoživkah se razvijeta še proteina APOBEC4 (A4) in APOBEC5 (A5) (Rogozin in sod., 2005; Severi in sod., 2011), z razvojem plazilcev pa se pojavi še protein APOBEC1 (A1), ki naj bi nastal s podvojitvami gena *AID* (Conticello in sod., 2005; Severi in sod., 2011). Protein A5 nato izgine z razvojem placentalnih sesalcev (Severi in sod., 2011), kjer pa se pojavijo in močno razširijo proteini APOBEC3 (A3), od enega samega proteina pri miših do kar 7 človeških proteinov A3: A3A, A3B, A3C, A3D, A3F, A3G in A3H (Jarmuz in sod., 2002; Conticello in sod., 2005).

2.2.2 Značilnosti strukture proteinov AID/APOBEC

Glavna skupna značilnost vseh od cinka odvisnih citidin deaminaz, ki katalizirajo reakcije pretvorbe 2-deoksicitidina (C) v 2-deoksiuridin (U), je ohranjena cink-vezavna regija proteina (sliki 5 in 6). Vsi člani družine AID/APOBEC imajo eno ali dve kopiji aminokislinskega motiva His-X-Glu-X₂₃₋₃₆-Pro-Cys-X₂-Cys, kjer X predstavlja katerokoli aminokislino (Conticello, 2008). Dva cisteinska (Cys) in en histidinski (His) ostanek sta potrebna za koordinacijo iona cinka (Zn^{2+}), glutamatni (Glu) ostanek pa za prenos protona (H^+). Ob posredovanju iona Zn^{2+} molekula vode reagira z ostankom Glu, pri čemer nastane hidroksidni anion (OH^-). Nato ostanek Glu odda proton dušikovemu atomu na mestu 3 v pirimidinskem obroču citozina, zaradi česar pride do destabilizacije dvojne vezi med atomoma N3 in C4. Zaradi tega postane ogljikov atom dovzet za nukleofilni napad z anionom HO^- . Nastane tetraedrični intermediat, proton H^+ pa se veže na ostanek Glu in tvori kovalentno vez z aminske skupino (-NH₂), kar povzroči prekinitev vezi med skupino -NH₂ in pirimidinskim obročem. Nastane nova vez med atomom C4 in kisikovim atomom, ki je na začetku pripadal vodi, uracil in amonijak (NH_3) pa se sprostita iz aktivnega mesta (Harris in Liddament, 2004).



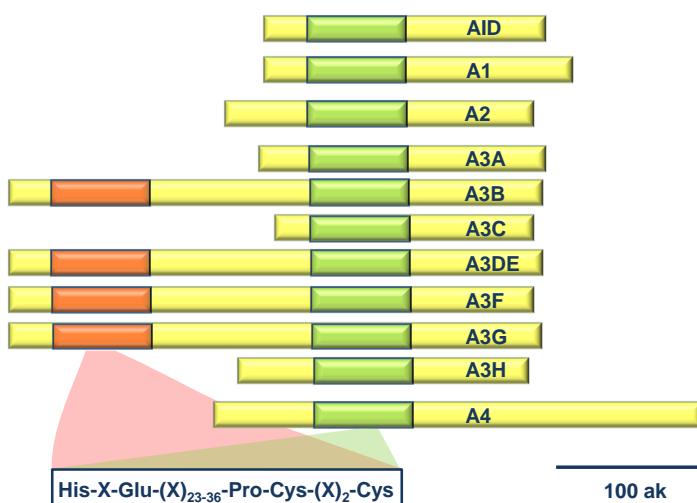
Slika 5: Predlagan mehanizem deaminacije citozina s citidin deaminazami (Harris in Liddament, 2004)
V reakciji deaminacije iz citidina z odstranitvijo aminske skupine v prisotnosti vode nastane uridin.

Figure 5: Proposed mechanism of cytosine deamination by cytidine deaminases (Harris and Liddament, 2004)

Conversion of cytidine to uridine is a result of an amine group removal in the presence of water.

Humani proteini AID, A1, A2, A3A in A3C imajo po eno samo domeno s CDA, preostali štirje proteini A3 (B, DE, F in G) in mišji A3 (mA3) pa po dve (slika 6). Pri proteinih A3 z dvema domenama je običajno encimsko aktivna le ena, medtem ko druga verjetno sodeluje

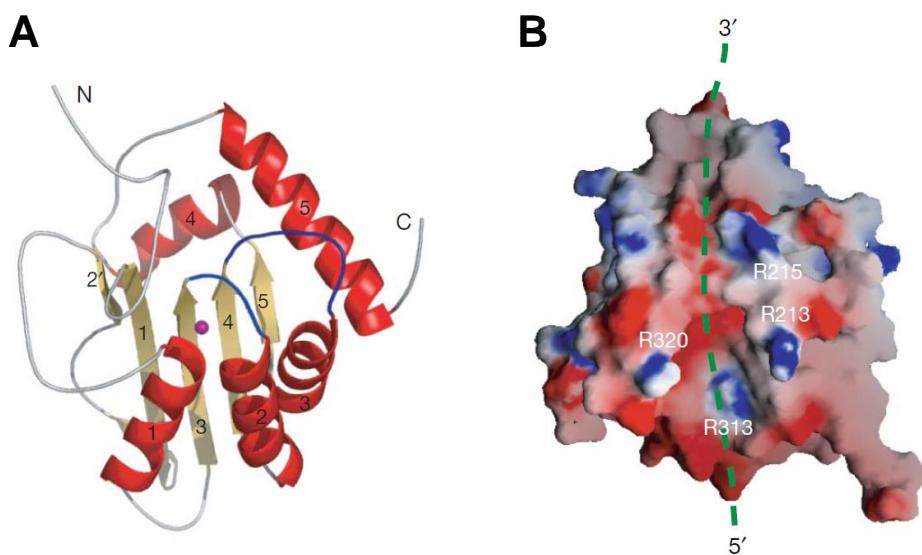
pri vezavi polinukleotidnega substrata. Dolžine proteinov so si med sabo sicer različne, domene s citidin deaminazno aktivnostjo pa so si po velikosti zelo podobne (Chiu in Greene, 2008; Arias in sod., 2012; Koito in Ikeda, 2013).



Slika 6: Shema organizacije domen humanih proteinov AID/APOBEC z ohranjenim skupnim zaporedjem (Chiu in Greene, 2008; Conticello, 2008)

Figure 6: Schematic representation of human AID/APOBEC domains organisation with conserved consensus site (Chiu and Greene, 2008; Conticello, 2008)

Primerjava struktur citidin deaminaz iz različnih organizmov kaže, da je mehanizem prepoznavanja in deaminiranja polinukleotidnih substratov evolucijsko ohranjen (Conticello, 2008). Do sedaj so rešili strukture petih članov družine AID/APOBEC: proteina A2 (Prochnow in sod., 2007), A3A (Byeon in sod., 2013), A3C (Kitamura in sod., 2012) in C-končnih katalitičnih domen proteinov A3G in A3F (Chen in sod., 2008; Bohn in sod., 2013). Razkrile so lastnosti, pomembne za specifičnost in afiniteto vezave enoverižnega polinukleotidnega substrata (slika 7). Ogrodje molekule sestavlja 5 ploskev beta, 5 do 6 vijačnic alfa pa z usmeritvijo ostankov Cys in His oblikuje katalitično mesto in pozitivno nabit kanal, kamor naj bi se prilegal in se vezal polinukleotidni substrat (Conticello in sod., 2007; Chen in sod., 2008; Stauch in sod., 2009). Od razlik v strukturi tega kanala med posameznimi AID/APOBEC je verjetno odvisna njihova različna preferenca do specifičnih zaporedij navzgor od tarčnega citozina (Beale in sod., 2004; Liddament in sod., 2004; Langlois in sod., 2005). Analiza modelov in struktur nakazuje, da bi endomenski proteini AID/APOBEC lahko delovali kot tetramerji (Prochnow in sod., 2007; Huthoff in sod., 2009; Stauch in sod., 2009), dvodomenski pa kot dimerji (Chelico in sod., 2006; Huthoff in sod., 2009; Chelico in sod., 2010; Shandilya in sod., 2010). Vendar pa glede na to, da je v raztopini protein AID encimsko aktiven kot monomer (Brar in sod., 2008) in da je protein A2 v raztopini monomer (Krzysiak in sod., 2012), je za rešitev problema oligomerizacije proteinov AID/APOBEC potrebna celotna struktura dvodomenskega proteina APOBEC skupaj s substratom, ki bo razkrila, kako se domene in molekule usmerjajo za izvedbo deaminacije citidina.



Slika 7: Struktura C-končne katalitične domene proteina A3G (Chen in sod., 2008)

(A) Prostorska razporeditev vijačnic alfa (rdeče) in trakov beta (rumeno) s koordiniranim ionom Zn^{2+} (vijolično). (B) Razporeditev naboja na površini domene. Mesta s pozitivnim nabojem so prikazana modro, mesta z negativnim rdeče, in mesta z nevtralnim nabojem belo-sivo. Označeni so tudi arginini (R), ki obdajajo aktivno mesto. Predviden položaj in polarnost enoverižne DNA sta nakazana z zeleno barvo.

Figure 7: Structure of the catalytically active C-terminal domain of A3G protein (Chen et al., 2008)

(A) Ribbon diagram with α -helices (red), β -strands (yellow), and coordinated Zn^{2+} ion (purple). (B) Protein's surface with positive (blue), negative (red) or neutral (gray-white) charge. Arginines (R) surrounding the active site are depicted, and the hypothesized position and polarity of single-stranded DNA are indicated (green).

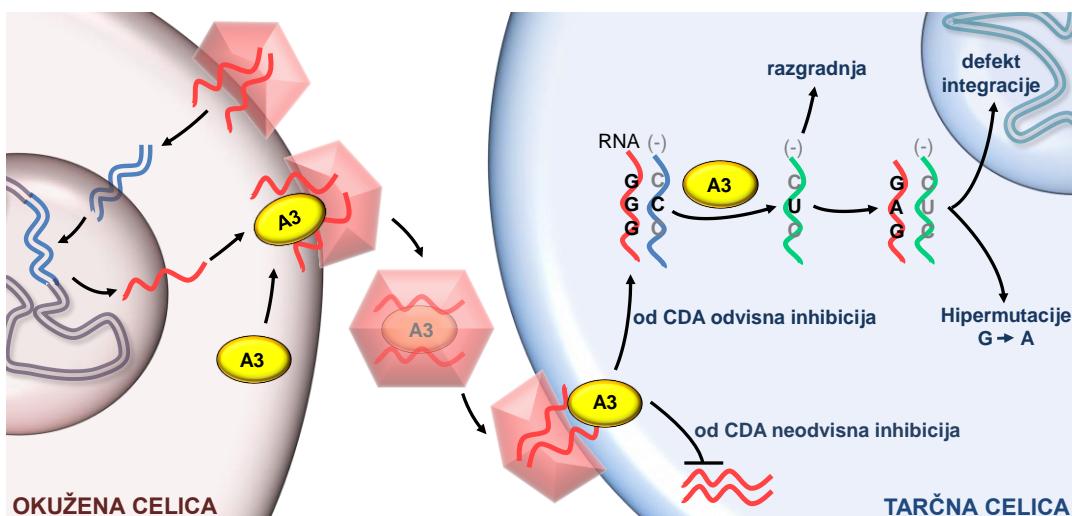
2.2.3 Funkcija proteinov AID/APOBEC

Proteini AID/APOBEC v organizmih opravljajo precej raznolike funkcije. Sodelujejo pri diverzifikaciji protiteles, uravnavanju prepisovanja genov, lipidnem metabolizmu in pri vzdrževanju stabilnosti genomov z inhibiranjem retroelementov (Conticello, 2012). Glede na to in z upoštevanjem, da je izražanje proteinov AID/APOBEC povečano v celicah, izpostavljenih retrovirusom in ostalim antigenom, t.j. imunske celice in tkivih, kamor lahko imunske celice prehajajo (Koning in sod., 2009; Refsland in sod., 2010), pa tudi v celicah s povečano aktivnostjo retroelementov, t.j. v testisih, ovarijih, in zarodnih matičnih celicah (Jarmuz in sod., 2002; Kano in sod., 2009), ter da so retroelementi v genomih sesalcev močno hipermutirani (Carmi in sod., 2011), je primarna funkcija proteinov AID/APOBEC po vsej verjetnosti obramba pred retroelementi.

2.2.3.1 Protein AID/APOBEC in inhibicija retrovirusov

Razmnoževanje retrovirusov inhibirajo številni proteini A3 (Arias in sod., 2012), pa tudi proteina A1 in AID (Ikeda in sod., 2008; Gee in sod., 2011; Liang in sod., 2013). Prvič so protivirusno delovanje proteinov AID/APOBEC odkrili pri proteinu A3G, ki inhibira virus

humane imunske pomanjkljivosti HIV-1 (angl. human immunodeficiency virus type 1) (Sheehy in sod., 2002). Virus HIV-1 je retrovirus, t.j. RNA-virus z dvema enakima molekulama RNA. Slednji se po vstopu virusa v celico prepišeta z virusno reverzno transkriptazo v DNA in se vgradita v genom gostitelja (Leblanc in sod., 2013). Ko se virus aktivira, se protein A3G veže na virusno RNA in se preko interakcije z virusnim proteinom Gag (Cen in sod., 2004; Burnett in Spearman, 2007; Wang in sod., 2007; Huthoff in sod., 2009) zapakira v virion ter se prenese v novo celico (slika 8). Tam v negativni (-) verigi cDNA, ki nastane s pomočjo reverzne transkripcije iz virusne RNA, pretvori C v U, kar se v kodirajoči (+) verigi virusne DNA bere kot mutacija G v A (Yu in sod., 2004b). Hipermutacije G v A virusne DNA lahko zmanjšajo fitnes virusa neposredno, zaradi neuspešne integracije, ali pa zaradi nastanka prezgodnjih stop kodonov, nefunkcionalnih proteinov in posledično neviabilnih virionov, lahko pa delujejo tudi kot signal za uničenje virusne DNA (Mbisa in sod., 2007; Bishop in sod., 2008), vse skupaj pa naj bi pri bolnikih omogočilo počasnejše napredovanje bolezni (Eyzaguirre in sod., 2013).



Slika 8: Model mehanizma inhibicije virusa HIV-1 s proteini A3 (Malim, 2009)

(-), negativna veriga virusne cDNA.

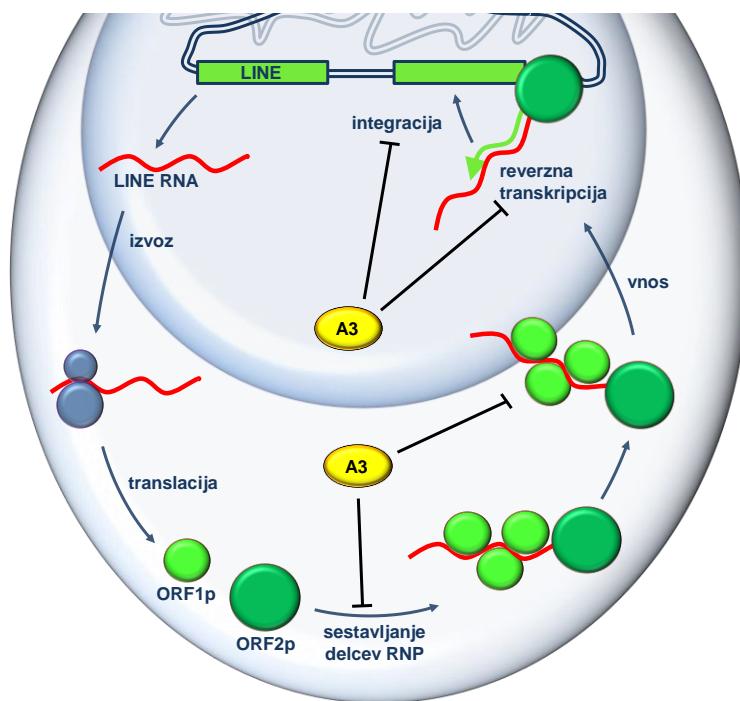
Figure 8: Model of HIV-1 inhibition by A3 proteins (Malim, 2009)

(-), negative viral cDNA strand.

Protein A3G pa lahko deluje proti retrovirusom tudi neodvisno od svoje encimske aktivnosti (Newman in sod., 2005; Iwatani in sod., 2007), z inhibicijo sinteze reverznih transkriptov, za kar je potrebna vezava virusne RNA (Belanger in sod., 2013). Od encimske aktivnosti neodvisni mehanizmi inhibicije proteina A3G vključujejo oviranje vezave začetnega oligonukleotida (celične tRNA) ali samega procesa reverzne transkripcije, preprečevanje integracije nove kopije virusne DNA v genom, lahko pa pride tudi do razgradnje intermedijatov (Li in sod., 2007; Luo in sod., 2007; Mbisa in sod., 2007; Bishop in sod., 2008). Na žalost je za obrambo virus HIV-1 razvil protein Vif (angl. viral infectivity factor (Vif)), ki lahko veže proteine A3 in jih tako označi za ubikvitinacijo in proteazno razgradnjo (Zheng in sod., 2012).

2.2.3.2 Proteini AID/APOBEC in inhibicija retrotranspozonov

Retrovirusom podoben mehanizem retrotranspozicije preko intermediata cDNA imajo tudi retrotranspozoni. Razmnoževanje številnih LTR- in ne-LTR-retrotranspozonov, ki izvirajo iz različnih organizmov, tako inhibirajo vsi člani skupine humanih proteinov A3 ter proteina AID in A1 (Koito in Ikeda, 2013). Odtisi encimske aktivnosti proteinov A3 se odražajo v genomu človeka in miši, kjer so v nukleotidnih zaporedjih LTR- in ne-LTR-retrotranspozonov prisotne številne, za proteine A3 značilne hipermutacije G v A (Carmi in sod., 2011). Kljub temu pa proteini AID/APOBEC lahko inhibirajo ne-LTR-retrotranspozone tudi neodvisno od svoje encimske aktivnosti (Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006; Stenglein in Harris, 2006; Hulme in sod., 2007; Kinomoto in sod., 2007; Niewiadomska in sod., 2007; Tan in sod., 2009; Ikeda in sod., 2011; Horn in sod., 2013), ali lokacije v celici (Bogerd in sod., 2006b). Kot je prikazano na sliki 9, bi sodeč po dosedanjih raziskavah lahko proteini AID/APOBEC inhibirali retrotranspozicijo na več tarčnih mestih in z več različnimi mehanizmi.



Slika 9: Model mehanizma inhibicije retrotranspozicije elementov LINE s proteinimi A3 (Han, 2010)
Figure 9: Model of LINE retrotransposition inhibition by A3 proteins (Han, 2010)

Delovanje proteinov A3 na stopnji citoplazemskih retrotranspozonskih delcev RNP nakazujejo rezultati imunoprecipitacijskih raziskav. V njih so potrdili vezavo med nekaterimi proteinimi APOBEC in retrotranspozonsko RNA (Niewiadomska in sod., 2007; Gallois-Montbrun in sod., 2008; Ikeda in sod., 2011) ter od RNA odvisno vezavo med proteinom A3 in proteinom ORF1p (Lovšin in Peterlin, 2009). Interakcije proteinov AID/APOBEC z delci RNP bi lahko spremenile mobilnost delcev RNP ali vplivale na

jedrni vnos. Citoplazemski proteini AID/APOBEC bi lahko vstopali v jedro skupaj z retrotranspozonskimi delci RNP, saj protein ORF2p vsebuje signal NLS, čeprav dejanska interakcija med proteinom AID/APOBEC in ORF2p še ni bila dokazana. Glede na to, da proteini APOBEC inhibirajo akumulacijo novih kopij retrotranspozonske DNA elementa hL1 (Kinomoto in sod., 2007; Ikeda in sod., 2011), bi lahko inhibirali reverzno transkripcijo in/ali integracijo v genom. Sodeč po mehanizmu inhibicije retrovirusov in LTR-retrotranspozonov (Dutko in sod., 2005; Mbisa in sod., 2010) bi lahko tudi na ne-LTR-retrotranspozone delovali preko blokade rezanja ali dostopa do tarčne genomske DNA. Vsekakor pa proteini AID/APOBEC inhibirajo retrotranspozicijo z več različnimi mehanizmi, ki še niso natančno raziskani.

2.2.3.3 Proteini AID/APOBEC in metabolizem RNA

Proteini AID/APOBEC so RNA/DNA-vezavni proteini, ki se v celicah združujejo v ribonukleoproteinske delce z visoko molekulsko maso (angl. high-molecular mass complex (HMM)), kjer so interakcije odvisne od RNA. Ti delci se nahajajo na mestih v celici, kjer poteka metabolizem RNA, kot so npr. stresne granule in telesca P (Chiu in Greene, 2008). Ta mesta so bogata s proteini, vpletjenimi v uravnavanje translacije, posttranskripcijsko utišanje z RNAi, ter v procesiranje mRNA (Wichroski in sod., 2006; Gallois-Montbrun in sod., 2007; Gallois-Montbrun in sod., 2008). Proteini A3 in ORF1p imajo nekatere od teh tarč skupne (Goodier in sod., 2007; Goodier in sod., 2013). Protein A3G veže tudi številne druge majhne nekodirajoče RNA (Wang in sod., 2007; Gallois-Montbrun in sod., 2008; Belanger in sod., 2013), vpletene v mehanizem RNAi, in preprečuje razgradnjo z molekulami miRNA označenih mRNA v telescih P, s tem pa tudi inhibicijo proteinske sinteze (Huang in sod., 2007; Liu in sod., 2012), vse skupaj pa nakazuje vpletjenost proteinov A3 v mehanizem utišanja z miRNA.

2.2.4 Protein AID

Protein AID je 24 kDa velika citozin deaminaza (Muramatsu in sod., 1999), ki je del pridobljenega in prirojenega imunskega odziva. Sodeluje namreč pri procesu dozorevanju protiteles po stiku z antigenom v celicah B, kjer z deaminacijo imunoglobulinskih genov sproži proces nastajanja somatskih hipermutacij in genskih preureditev, s čimer iz razreda protiteles IgM nastanejo razredi IgG, IgA ali IgE (Delker in sod., 2009). Tako evolucijsko vse od pojava rib dalje daje fleksibilnost humorальнemu imunskemu odzivu. Pri človeku se najmočneje izraža v aktiviranih celicah B v kličnih centrih (Faili in sod., 2002) ter v tkivih, ki se odzivajo na estrogen (Pauklin in sod., 2009). Celična lokalizacija proteina AID je nadzorovana, saj mora biti količina encima v jedru, kjer deluje, omejena. Protein AID je citoplazemski protein, ki pa se premika med jedrom in citoplazmo s pomočjo jedrnega signala za izvoz in vnos (Ito in sod., 2004). Ko ga celica ne potrebuje več, ga razgradi v proteasomu (Aoufouchi in sod., 2008). Ali je njegov substrat DNA ali RNA, še vedno ni

znano, saj lahko poleg enoverižne DNA (Petersen-Mahrt in sod., 2002) preureja tudi virusno RNA (Liang in sod., 2013). Vlogo proteina AID v prirojeni imunosti pa nakazuje tudi sposobnost nekaterih sesalskih in nesesalskih proteinov AID za inhibicijo mišjih LTR-in humanega retrotranspozona L1 (Esnault in sod., 2006; MacDuff in sod., 2009). Protein AID lahko deaminira metilirane citozine v bakterijskem testu, njegovo izražanje pa je povečano v človeških zarodnih embrionalnih in spolnih celicah (Morgan in sod., 2004), kar nakazuje njegovo vpletost v epigenetsko uravnavanje izražanja genov, ki je bila že dokazana *in vivo* na embrijih ribe cebrice (Rai in sod., 2008). V primerjavi s proteinom AID iz ribe cebrice pa ima humani AID *in vitro* zanemarljivo afiniteto do metiliranih citozinskih substratov, zaradi česar naj bi bila ta funkcija pri človeku nemogoča (Nabel in sod., 2012; Abdouni in sod., 2013).

2.2.5 Protein A1

Protein A1 je 27 kDa velik protein, ki se izraža v gastrointestinalnih tkivih sesalcev, kjer kot katalitična podenota kompleksa za urejanje RNA z deaminacijo citidina preureja mRNA proteina ApoB (Navaratnam in sod., 1993; Teng in sod., 1993). Na mestu 6666 pretvori kodon, ki kodira glutamin, v stop kodon, zaradi česar iz dalje oblike proteina ApoB100 nastane krajša ApoB48. Protein ApoB48 je glavna komponenta hidrofilne ovojnice hilomikronov, lipoproteinov z nizko gostoto (angl. very low density lipoproteins (VLDL)), ki transportirajo trigliceride iz črevesa v tkiva, medtem ko je protein ApoB100 potreben za proizvodnjo LDL (angl. low-density lipoproteins) v jetrih (Harris in Liddament, 2004). RNA proteina ApoB pa ni edina tarča proteina A1 (Harris in sod., 2002; Gee in sod., 2011) in vpletost v metabolizem lipidov verjetno ne njegova glavna funkcija. Vplet en naj bi namreč bil v proces uravnavanja prepisovanja preko demetilacije metiliranih citozinov v nevronih (Guo in sod., 2011), v prenos dednih epigenetskih vzorcev (Nelson in sod., 2012) in v uravnavanje izražanja proteinov s preurejanjem koncov 3'-UTR številnih tarčnih RNA, identificiranih v človeškem transkriptomu (Rosenberg in sod., 2011). Pri glodavcih je nujno potreben za razvoj embrija (Farese in sod., 1995), njegovo izražanje pa je povečano v vranici in jetrih, pa tudi v testisih in ovarijih, kjer ima retrotranspozicija največji učinek *in vivo* (Ikeda in sod., 2011). Mnogi sesalski proteini A1 tako preko deaminiranja virusne cDNA inhibirajo številne viruse in mišje LTR-retrotranspozone (Bishop in sod., 2004a; Bishop in sod., 2004b; Ikeda in sod., 2008; Petit in sod., 2009), poleg tega pa verjetno preko interakcije z RNA zavirajo tudi retrotranspozicijo humanega retrotranspozona L1 neodvisno od njihove encimske aktivnosti (Ikeda in sod., 2011). Zaščitna vloga proteinov A1 proti retroelementom se je verjetno razvila že pred pojavom sesalcev, saj tudi pred kratkim odkrit protein A1 pri kuščarju, ki nima opazne vloge pri editiranju mRNA apoB (Severi in sod., 2011), inhibira retrotranspozicijo elementov LINE (Lindič in sod., 2013).

2.2.6 Protein A2

Protein A2 je 26 kDa velika citidin deaminaza (Liao in sod., 1999). Za razliko od svojih paralogov ima *in vitro* zelo nizko aktivnost CDA (Lada in sod., 2011), kljub temu pa raziskave *in vivo* na transgenskih miših razkrivajo, da ob povečanem izražanju lahko aktivno deaminira specifične transkripte RNA, kar lahko vodi preko vnetja do razvoja raka (Okuyama in sod., 2012). Izražanje proteina A2 uravnava transkripcijski faktor NF-κB, najmočneje pa se izraža v srčni in skeletnih mišicah, zato je morda vpletен v pravilen razvoj mišic (Matsumoto in sod., 2006), kar potrjujejo raziskave na ribi cebrici (Etard in sod., 2010), miših (Sato in sod., 2010) in mioblastnih celičnih linijah (Vonica in sod., 2011). Protein A2 vpliva tudi na regeneracijo retine in razvoj optičnega živca (Powell in sod., 2012), in na razvoj levo-desne osi pri embrijih ribe cebrice in žabe kremljičarke (Vonica in sod., 2011), vse skupaj pa nakazuje, da uravnava izražanje genov na epigenetski ravni, morda z demetilacijo DNA (Okuyama in sod., 2012; Powell in sod., 2012).

2.2.7 Proteini A3

Proteini A3 so prisotni samo pri placentalnih sesalcih (Conticello, 2008). Iz enega samega pri miših (mA3) so se z genskimi duplikacijami razširili na kar 7 pri primatih: A3A do A3H, nato pa je pri proteinih A3B, A3D, A3F in A3G prišlo še do znotrajgenske podvojite domen. Pri človeku so vsi geni za proteine A3 na kromosому 22 (Jarmuz in sod., 2002). Njihova najpomembnejša vloga je obramba genoma pred virusi (predvsem retrovirusi) in retrotranspozoni.

2.2.7.1 Protein A3A

Protein A3A je enodomenski 23 kDa velik protein, ki deluje specifično na enoverižno DNA, in je dovolj majhen, da lahko prehaja jedrno ovojnico (Chiu in Greene, 2008), vendar je lokaliziran tako v jedru kot v citoplazmi. Zato je spekter njegovih tarč precej širok, predvsem pa so te endogenega izvora, saj pri *in vitro* eksperimentih od vseh humanih proteinov A3 najbolj učinkovito inhibira transpozicijo mišjih LTR-elementov IAP in MusD (Bogerd in sod., 2006a; Chen in sod., 2006; Ikeda in sod., 2011) in ne-LTR-retrotranspozonov hL1 in Alu (Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006), pri čemer uporabi od deaminacije neodvisen mehanizem (Bogerd in sod., 2006a; Chen in sod., 2006), ki pa je najbrž odvisen od vezave RNA (Niewiadomska in sod., 2007). Inhibira tudi replikacijo virusa HBV (Abe in sod., 2009) in z adenovirusom povezanega virusa (AAV), ki sicer ni retrovirus, a se podvaja v jedru kot enoverižna DNA (Chen in sod., 2006), za kar pa encimska aktivnost proteina A3A ni potrebna (Narvaiza in sod., 2009). Zanimivo je, da protein A3A kljub temu v celicah 293T ne zavira replikacije virusa HIV-1 (Bogerd in sod., 2006a; Kinomoto in sod., 2007; Hultquist in sod., 2011) in se ne vključi v virione (Goila-Gaur in sod., 2007; Aguiar in Peterlin, 2008), medtem ko pa

v tarčnih monocitnih celicah inhibira zgodnjo fazo okužbe z virusom HIV-1/ ΔVpx (Berger in sod., 2010; Koning in sod., 2011). Izražanje proteina A3A se poveča tudi kot odziv na prisotnost tuje DNA v citoplazmi makrofagov in vodi v deaminacijo in razgradnjo tuje DNA (Stenglein in sod., 2010). Zato mu pripisujejo pomembno vlogo v prirojeni imunosti pri vnetnih odzivih in pri zgodnjem odgovoru na virusno okužbo, saj se njegovo izražanje močno poveča ob prisotnosti citokina IFN- α v nezrelih monocitih (Koning in sod., 2009). Kopije mRNA proteina A3A so v povisanih koncentracijah prisotne tudi v pljučih, keratinocitih, vranici, celicah tankega črevesa in placenti (Refsland in sod., 2010) ter pri kolorektalnem adenokarcinomu, kronični mieloični levkemiji in Burkittovem limfому (Chiu in Greene, 2008). Protein A3A je sposoben deaminacije metiliranih citozinov (Wijesinghe in Bhagwat, 2012; Suspene in sod., 2013), zato njegovo neuravnano izražanje verjetno vodi v genotoksičnost, posledično pa zaustavitev celičnega cikla ali razvoj raka (Landry in sod., 2011; Suspene in sod., 2011a; Shinohara in sod., 2012), vendar pa naj bi bil endogeni A3A lociran samo v citoplazmi in je zato negenotoksičen (Land in sod., 2013).

2.2.7.2 Protein A3B

Protein A3B je dvodomenski protein, katerega gen se izraža v celicah T, nepermisivnih za virus HIV-1, pa tudi v pljučih, vranici, keratinocitih, celicah debelega in tankega črevesa (Refsland in sod., 2010), še posebno veliko pa ga je v raznolikih tipih rakavih celic (Chiu in Greene, 2008), kjer njegovo delovanje povezujejo s povečano genomsko nestabilnostjo in razvojem raka (Shinohara in sod., 2012; Burns in sod., 2013; Taylor in sod., 2013). Ker je njegovo izražanje povečano tudi v testisih, ovarijih in izvornih celicah, se predvideva, da je njegova najpomembnejša funkcija preprečevanje dednih insercij elementov L1 in Alu v zarodnih celicah (Wissing in sod., 2011). Ker se torej ne izraža v tistih celicah T in makrofagih (Bishop in sod., 2004b), ki so tarče virusa HIV-1, virusni protein Vif ni mogel razviti aktivnosti proti proteinu A3B. Tako se protein Vif ne veže na A3B, zato lahko protein A3B delno inhibira ne samo replikacijo virusa HIV-1/ ΔVif , temveč tudi divji tip virusa HIV-1 (Bishop in sod., 2004b; Hultquist in sod., 2011). Čeprav je protein A3B veliko večji kot protein A3A, je zaradi posedovanja signala NLS prav tako sposoben preiti v jedro (Pak in sod., 2011). Protein A3B inhibira tudi številne druge retroviruse (Arias in sod., 2012), za kar potrebuje svojo encimsko aktivnost, kar potrjujejo mutacije, odkrite v genomu testiranih virusov (Bishop in sod., 2004a; Suspene in sod., 2005). Protein A3B podoben mehanizem uporablja tudi za zaviranje mišjih LTR-elementov IAP in MusD (Bogerd in sod., 2006a; Chen in sod., 2006), kar so potrdili *in vitro* v celičnih kulturah, medtem ko za inhibicijo ne-LTR-elementov hL1 in Alu njegova encimska aktivnost ni potrebna (Bogerd in sod., 2006b; Muckenfuss in sod., 2006; Stenglein in Harris, 2006). Inhibitorno delovanje endogenega proteina A3B proti elementu L1 so potrdili v transformiranih in človeških matičnih celicah (Wissing in sod., 2011).

2.2.7.3 Protein A3C

Protein A3C je v celici prisoten tako v jedru kot v citoplazmi in ima eno domeno CDA (Jarmuz in sod., 2002). Velik je 22 kDa in je potencialni mutator celične DNA v bakterijskem testu (Langlois in sod., 2005). Povečano izražanje proteina A3C so do sedaj opazili v vranici, pljučih, limfocitih periferne krvi, ovarijih in testisih, mehurju in možganih (Jarmuz in sod., 2002; Refsland in sod., 2010) in je neodvisno od citokina IFN- α (Koning in sod., 2009), poveča pa se ob povečanem delovanju proteina p53 (Liao in sod., 2012). Protein A3C sicer učinkovito inhibira replikacijo retrovirusov SIVmac/ ΔVif in SIVagm/ ΔVif (Yu in sod., 2004a), za kar naj bi bila potrebna dimerizacija (Stauch in sod., 2009; Horn in sod., 2013), in številnih drugih virusov (Kinomoto in sod., 2007; Vartanian in sod., 2008; Suspene in sod., 2011b). Zelo šibko deluje proti virusu HIV-1 (Bishop in sod., 2004b; Bogerd in sod., 2006a; Hultquist in sod., 2011), saj se nanj veže virusni protein Vif, kot nakazuje tudi kristalna struktura proteina A3C (Kitamura in sod., 2012). Za inhibicijo virusov uporablja mehanizem deaminacije virusne cDNA (Yu in sod., 2004a), preko do sedaj še neodkritega mehanizma pa inhibira tudi mišje LTR-elemente IAP in MusD (Chen in sod., 2006) ter element Ty1 iz kvasovke (Dutko in sod., 2005). Protein A3C deloma zavira tudi retrotranspozicijo elementov L1 (Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006; Kinomoto in sod., 2007; Niewiadomska in sod., 2007), pri čemer ne potrebuje encimske aktivnosti, saj inhibira reverzno transkripcijo retrotranspozonske RNA (Horn in sod., 2013).

2.2.7.4 Protein A3D

Funkcionalen protein A3D je sestavljen iz dveh domen, A3D in A3E, ki sta kodirani v samostojnih genih na bližnjih lokusih (Jarmuz in sod., 2002). V celici je prisoten predvsem v citoplazmi, izraža pa se v celicah B in T, pljučih, vranici in timusu (Refsland in sod., 2010) in se ne odziva na citokin IFN- α (Koning in sod., 2009). Njegova natančnejša vloga še ni bila določena, je pa bilo dokazano, da deluje proti virusu HIV-1/ ΔVif (Dang in sod., 2006; Hultquist in sod., 2011) in retrotranspozonom hL1 in Alu (Stenglein in Harris, 2006; Kinomoto in sod., 2007; Niewiadomska in sod., 2007; Tan in sod., 2009). Obstajajo tri polimorfne oblike gena za proteina A3D, od katerih dve povzročata znižano protivirusno delovanje proteina A3D proti virusu HIV-1, ena pa aktivnost proti retrotranspozonu Alu. V mlajši človeški zgodovini se A3D razvija pod negativno selekcijo, kar kaže, da se njegova aktivnost vzdržuje v človeški populaciji za obrambo gostitelja pred retroelementi (Duggal in sod., 2013).

2.2.7.5 Proteina A3F in A3G

Proteina A3F in A3G sta si precej podobna, tako po lastnostih kot po delovanju. Oba sta sestavljena iz dveh domen CDA, velika sta 46 kDa in sta lokalizirana v citoplazmi. Njuno

izražanje je povečano v imunskih celicah B in T (Koning in sod., 2009). V skladu s tem inhibirata številne retrovirusa, vključno z virusom HIV-1/ Δ Vif (Arias in sod., 2012). Sicer je protein A3G v primerjavi s proteinom A3F močnejši inhibitor virusa HIV-1 (Chaipan in sod., 2013), kar je verjetno posledica tega, da je raven mRNA za protein A3G v celicah, dojemljivih za infekcijo, tudi do 10-krat višja (Refsland in sod., 2010). Oba proteina delujeta preko hipermutiranja virusne cDNA (Bishop in sod., 2004b), pa tudi preko mehanizma, neodvisnega od encimske aktivnosti (Holmes in sod., 2007), ki vključuje inhibicijo reverzne transkripcije in/ali integracije novih kopij virusne cDNA (Newman in sod., 2005; Holmes in sod., 2007; Iwatani in sod., 2007; Imahashi in sod., 2012). Protein A3F sicer močneje zavira integracijo nove virusne DNA, kar je verjetno posledica različnih afinitet do substrata. Protein A3F namreč zmanjša procesiranje 3'-konca virusne DNA, medtem ko A3G povzroča podaljšanje virusne DNA za 6 bp na 3'-koncu LTR, zaradi česar se virusna DNA ne more vgraditi (Mbisa in sod., 2010). Proteina A3F in A3G se razlikujeta tudi v afiniteti do tarčnega nukleotidnega zaporedja za deaminacijo. Protein A3G prednostno deaminira dinukleotid 5'-CC, protein A3F pa dinukleotid 5'-TC (Bishop in sod., 2004b; Liddament in sod., 2004). Tudi vzorec tkivno specifičnega izražanja genov za A3F in A3G je podoben. Izražanje obeh je povečano v pljučih, vranici in testisih, mRNA proteina A3F pa je v ovarijih v primerjavi z mRNA za ostale proteine A3 najvišje izražena (Refsland in sod., 2010), kar nakazuje, da ima morda pomembno vlogo pri vzdrževanju stabilnost genoma spolnih celic. V prid tej teoriji kaže njegova sposobnost inhibicije retrotranspozicije elementa L1, ki je neodvisna od encimske aktivnosti (Muckenfuss in sod., 2006; Stenglein in Harris, 2006), in v primerjavi s proteinom A3G močnejša (Muckenfuss in sod., 2006; Niewiadomska in sod., 2007). Oba proteina pa inhibirata retrotranspozicijo LTR-retrotranspozonov, in sicer mišijih elementov IAP in MusD (Chen in sod., 2006) ter elementa Ty1 iz kvasovk (Dutko in sod., 2005).

2.2.7.6 Protein A3H

Protein A3H je evolucijsko najbolj oddaljen od ostalih proteinov A3 (OhAinle in sod., 2006) in je znan po svojem funkcionalnem polimorfizmu. Pri človeku so identificirali 4 haplotipe (I do IV). Haplontipi I, III in IV niso aktivni proti retrovirusom in retrotranspozonom, kar pripisujejo njihovi nestabilnosti v celici (OhAinle in sod., 2008). Citoplazemski haplotip II proteina A3H (Li in Emerman, 2011), ki se najpogosteje pojavlja v afriški populaciji, pa je v celici stabilen in inhibira retrotranspozicijo elementa hL1 in Alu *in vitro* (OhAinle in sod., 2008; Tan in sod., 2009), ima pa tudi protivirusno aktivnost (OhAinle in sod., 2008; Ooms in sod., 2012). Glede na to, da je njegovo izražanje povečano v nepermisivnih in neaktiviranih celicah T, to pa se še dodatno poveča v prisotnosti dejavnikov aktivacije celic T, je njegova predlagana vloga *in vivo* inhibicija virusov (Koning in sod., 2009; Refsland in sod., 2010).

2.2.8 Protein A4

Protein A4 je predzadnji odkriti predstavnik proteinske družine APOBEC (Rogozin in sod., 2005). Kljub trenutno še neznani funkciji ga na podlagi evolucijskih analiz, ki kažejo večjo oddaljenost od ostalih proteinov AID/APOBEC, povezujejo z encimi, ki preurejajo tRNA (Conticello in sod., 2007; Conticello, 2008), na osnovi povečanega izražanja v testisih sesalcev pa s preurejanjem mRNA med spermatogenezo (Rogozin in sod., 2005).

2.2.9 Protein A5

Zapis za protein A5 so odkrili šele pred nedavnim v genomih vrečarja, zelenega kuščarja anoli in žabe kremljičarke (Severi in sod., 2011). Kljub temu, da njegova deaminazna aktivnost še ni bila preučena, se iz njegove prisotnosti v genomih neplacentalnih vretenčarjev in podobnosti s proteini AID in A3 predpostavlja, da so蛋白 A5 funkcionalni homologi proteinov A3 (Severi in sod., 2011).

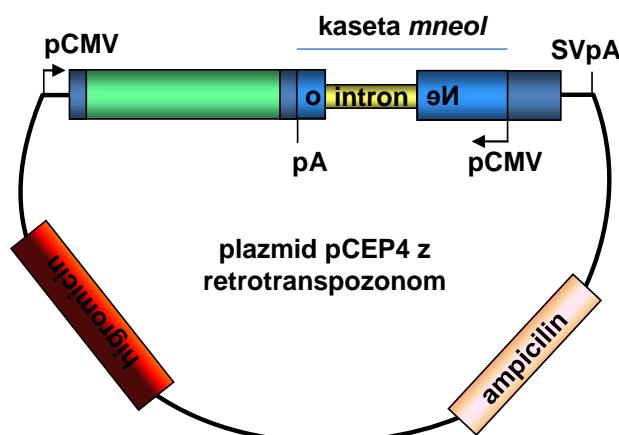
3 MATERIAL IN METODE

Delo je bilo sestavljeno iz molekulskega kloniranja zapisov za proteine AID/APOBEC ter njihovega izražanja in spremljanja vpliva na retrotranspozicijo ne-LTR-retrotranspozonov v sesalskih celicah. Če v nadaljevanju ni napisano drugače, smo pri delu upoštevali že opisane protokole (Sambrook in Russell, 2001). Uporabljene kemikalije smo naročili pri podjetjih Sigma-Aldrich (ZDA) ali Merck (ZDA), uporabljene začetne oligonukleotide pa pri podjetju Eurofins MWG Operon iz Nemčije.

3.1 PLAZMIDNA DNA

3.1.1 Plazmidi z zapisi za retrotranspozone

Zapisi za retrotranspozone, ki smo jih testirali v naši raziskavi, so bili vstavljeni v sesalski ekspresijski plazmid pCEP4 (Life Technologies, ZDA), velik 10,2 kb (slika 10). Plazmid pCEP4 nosi citomegalovirusni promotor (CMV), ki omogoči povečano izražanje vstavljenega gena za retrotranspozon (Boshart in sod., 1985). Terminacijo transkripcije in poliadenilacijo nastale mRNA omogoči poliadenilacijski signal SVpA (angl. simian virus 40 polyadenylation). Zapisa za mesto začetka podvojevanja iz virusa Epstein-Barr (oriP) in jedrni antigen EBNA-1 omogočata podvajanje izven kromosoma v humanih, opičjih in pasjih celicah (Reisman in Sugden, 1986). Plazmid pCEP4 nosi zapis za odpornost proti ampicilinu, ki omogoča selekcijo transformiranih bakterijskih celic, ter gen za odpornost proti higromicinu B, ki omogoča selekcijo transficiranih sesalskih celic.



Slika 10: Shematski prikaz sesalskega ekspresijskega plazmida pCEP4 z zapisom za retrotranspozon (Moran in sod., 1996)

pCMV, citomegalovirusni promotor; SVpA, pA, signala za poliadenilacijo.

Figure 10: Schematic representation of retrotransposon encoding mammalian expression vector pCEP4 (Moran et al., 1996)

pCMV, cytomegalovirus promoter; SVpA, pA, polyadenylation signals.

V naši raziskavi smo uporabili štiri plazmide z ogrodjem pCEP4 z vstavljenimi zapisi za retrotranspozone, in sicer za humani retrotranspozon L1 (plazmid pJM101) (Moran in sod., 1996), za retrotranspozona ZfL2-2 (pBZ2-5) in ZfL2-1 (p77.52) iz ribe cebrice (Sugano in sod., 2006) ter za retrotranspozon UnaL2 (pI-29) iz jegulje (Kajikawa in Okada, 2002). Nukleotidno zaporedje vseh testiranih retrotranspozonov je bilo prekinjeno z genom za neomicin fosfotransferazo v protismerni orientaciji, le-ta pa je bil prekinjen z intronom 2 iz gena za γ -globin v smiselnici orientaciji. Le ob uspešni transkripciji celotnega retrotranspozonskega zaporedja, izrezu introna iz nastale mRNA, reverzni transkripciji v cDNA ter integraciji retrotranspozona v genom celice, se lahko pod kontrolo promotorja CMV izrazi gen za odpornost proti neomicinu, ki nam služi kot marker pri testu retrotranspozicije (slika 12 spodaj). Kot negativno kontrolo smo pri testu retrotranspozicije uporabljali tudi plazmide z zapisi za retrotranspozicijsko neaktivne mutante zgoraj omenjenih retrotranspozonov. Testirali smo delecijska mutanta koncev 3'-UTR retrotranspozonov ZfL2-2 in ZfL2-1 (pBB4 in p74.18) (Sugano in sod., 2006), pa tudi mutanta proteinov ORF1p (pJM111) in ORF2p (pJM105) retrotranspozona hL1 (Moran in sod., 1996).

3.1.2 Plazmidi z zapisi za proteine AID/APOBEC

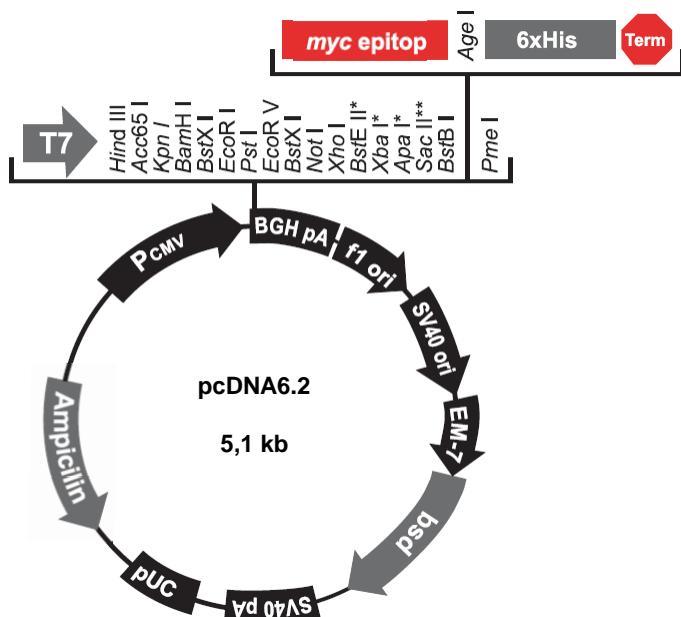
3.1.2.1 Priprava plazmidov z zapisi za proteine AID/APOBEC

Za izražanje zapisov za proteine AID/APOBEC v sesalskih celičnih linijah smo pripravili sesalske ekspresijske vektorje z zapisi za proteine AID/APOBEC, označene z različnimi epitopi, ter njihove encimske neaktivne in delecijske mutante. Želene zapisne za proteine AID/APOBEC smo iz izvornih plazmidov pomnoževali z verižno reakcijo s polimerazo (angl. polymerase chain reaction (PCR)), ob uporabi DNA-polimeraze Platinum Pfx (Life Technologies, ZDA) in po navodilih proizvajalca. Velikost pomnoženih fragmentov smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo v 1-odstotnem agaroznem gelu, DNA pa smo za potrebe kloniranja izolirali iz agaroznega gela z uporabo kompleta QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Nemčija). Encimske in druge mutante smo pripravili z usmerjeno mutagenezo, plazmid hA3AGFPcs2 pa s tehnologijo kloniranja Gateway. Ustreznost v plazmide vstavljenih zapisov za proteine AID/APOBEC smo potrdili z določanjem njihovega nukleotidnega zaporedja po Sangerjevi metodi pri podjetju Eurofins MWG Operon (Nemčija), z uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov. Bakterijske celice, ki smo jih uporabljali pri kloniranju in namnoževanju plazmidne DNA, so opisane pod točko 3.1.3.1.

3.1.2.1.1 Restrikcijsko kloniranje

Večino zapisov za proteine AID/APOBEC smo z restrikcijskim kloniranjem vstavili v sesalski ekspresijski vektor pcDNA6.2 (Life Technologies, ZDA), velik 5,1 kb. Plazmid

pcDNA6.2 smo izbrali zato, ker ne nosi zapisa za odpornost proti neomicinu, ki smo jo uporabljali kot marker uspešne retrotranspozicije. V plazmidu pcDNA6.2 je izražanje vstavljenega zapisa za protein pod kontrolo promotorja CMV (slika 11) (Boshart in sod., 1985), ustrezni bralni okvir pa nam omogoča izražanje proteina s C-končno oznako myc in polihistidinsko oznako (Evan in sod., 1985; Lindner in sod., 1997). Gen za β -laktamazo, ki daje odpornost proti ampicilinu, služi kot selekcijski marker za rast transformiranih bakterijskih celic v gojišču z dodanim ampicilinom, gen za odpornost proti blasticidinu pa omogoča selekcijo sesalskih celic (Kimura in sod., 1994).



Slika 11: Karta ekspresijskega vektorja pcDNA6.2 s poliklonskim mestom (pcDNA6.2/myc-His, 2010)
 myc in 6xHis, zapisa za C-končno oznako myc in polihistidinsko oznako; Term, terminacijsko zaporedje; T7, pCMV, EM7, promotorji; BGH pA, signal za poliadenilacijo; f1 ori, SV40 ori, pUC, zapisi, ki omogočajo replikacijo plazmida, t.j. fagmida; bsd, zapis za odpornost proti blasticidinu.

Figure 11: pcDNA6.2 expression vector map with multiple cloning site (pcDNA6.2/myc-His, 2010)
 myc, 6xHis, C-terminal protein tags; Term, terminator sequence; T7, pCMV, EM7, promoters; BGH pA, polyadenylation signal; f1 ori, SV40 ori, pUC, origins of replication; bsd, blasticidine resistance gene.

Nukleotidna zaporedja za protein AID iz ribe cebrice (zfAID), njegovega encimsko neaktivnega mutanta zfAIDC102A ter zapisa za proteina A2a (zfA2a) in A2b (zfA2a) smo pomnožili iz že opisanih vektorjev pcDNA3.1V5-DEST AID WT, pcDNA3.1V5-DEST AID CM, DEST40-zfApobec2a WT, pCMV3X HA zfApobec2b WT (Rai in sod., 2008) s pari začetnih oligonukleotidov zAIDKpnIf/zAIDNotIr, zA2aKpnIf/zA2aNotIr in zA2bKpnIf/zA2bNotIr (preglednica 1). Dobljene produkte smo po rezanju z restriktijskima encimoma KpnI in NotI vstavili v vektor pcDNA6.2 in tako dobili plazmide pcDNA6.2zfAID.myc, pcDNA6.2zfAIDC102A.myc, pcDNAzfA2a.myc in pcDNA6.2zfA2b.myc.

Bakterijska ekspresijska plazmida pTrc99a z zapisoma za dve naravni varianti kuščarjevega proteina A1a (lizA1a) (Severi in sod., 2011), lizA1aF3 (R73K, Y116C) in lizA1aF8 (N52D), sta bila darilo prof. Conticella. S pomočjo začetnih oligonukleotidov lizA1HindIIIs in lizA1XhoIas smo omenjena zapisa pomnožili in ju vstavili v plazmid pcDNA6.2 ter tako dobili plazmida pcDNA6.2.lizA1aF3.myc in pcDNA6.2.lizA1aF8.myc.

Plazmide za izražanje mišjega proteina A3 (mA3) in humanih proteinov A1 (hA1), A2 (hA2), AID (hAID), A3C (hA3C), A3F (hA3F), A3G (hA3G), A3D (hA3D), A3H (hA3H), A3H-L (hA3H-L), A3A (hA3A) in A3B (hA3B) smo pripravili z restriktivnim kloniranjem iz že opisanih plazmidov pcDNA3.1mA3.V5 (Okeoma in sod., 2007), pcDNA3.1hA1.V5, pcDNA3.1hA2.V5, pcDNA3.1hAID.V5, pcDNA3.1A3C.V5, pcDNA3.1A3F.V5, pcDNA3.1A3G.V5 (Zheng in sod., 2004), pcDNA3.1A3DE.V5 (Dang in sod., 2006), pcDNA3.1A3H.V5, pcDNA3.1A3H-L.V5 (Dang in sod., 2008), ter pKA3A in pKA3B (Bogerd in sod., 2006a). Zapise za proteina mA3 in hA3G smo iz zgoraj omenjenih izhodiščnih plazmidov vstavili v plazmid pcDNA6.2 preko restriktivnih mest *Xho*I in *Kpn*I, in dobili plazmida pcDNA6.2mA3.myc in pcDNA6.2hA3G.myc. Plazmida za izražanje zapisov za proteina hA3A in hA3B, pcDNA6.2hA3A.HA in pcDNA6.2hA3B.HA, smo pripravili z vstavljanje preko mest *Hind*III in *Xho*I, plazmide pcDNA6.2hAID.V5, pcDNA6.2hA2.V5, pcDNA6.2hA3D.V5, pcDNA6.2hA3H.V5 in pcDNA6.2hA3H-L.V5 za izražanje zapisov za proteine hAID, hA3D, hA3H in hA3H-L pa preko mest *Kpn*I in *Age*I. Fragmente z zapisi za protein hA3C, hA3F in hA1 smo iz izhodiščnih plazmidov v plazmid pcDNA6.2 prestavili s pomočjo restrikta *Hind*III in *Not*I in tako dobili plazmide pcDNA6.2hA3C.myc, pcDNA6.2hA3F.myc in pcDNA6.2hA1.myc.

Deleciji posameznih domen proteina hA3B smo pripravili s pomnoževanjem N- in C-končnega dela nukleotidnega zaporedja za protein hA3B iz izvornega plazmidu pKA3B (Bogerd in sod., 2006a) s pari začetnih oligonukleotidov NA3B.HindIIIs/NA3B.XhoIas in CA3B.HindIIIs/CA3B.XhoIas ter vstavljanjem zaporedij v plazmid pcDNA6.2. Dobili smo plazmida pcDNA6.2NA3B.myc in pcDNA6.2CA3B.myc.

Pri restriktivnem kloniranju smo uporabljali restriktivne encime in DNA ligazo T4 proizvajalca New England BioLabs (ZDA) ter začetne oligonukleotide, ki so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1: Seznam začetnih oligonukleotidov, uporabljenih pri restrikcijskem kloniranju
Table 1: List of restriction cloning primers

Ime	Nukleotidno zaporedje (5' proti 3')
zA2bKpnIf	ACGTGGTACCATGGCAGACAAAAAGGACAGC
zA2bNotIr	ACGTGCAGCCGCCCTTAAATATCCTGCAATC
zAIDKpnIf	ACGTGGTACCATGATCTGCAAGCTGGACAGTGTGCTC
zAIDNotIr	GCGGCCGCTAACCCAAGAAGAGCAAAACATCCCT
zA2aKpnIf	ACGTGGTACCATGGCCGATAGAAAGGGCAGC
zA2aNotIr	GCGGCCGCCCTGCAGGATGTCGGCCAG
lizA1HindIIIs	GAATAAGCTTATGGAATTGCGCTGCAATT
lizA1XhoIas	GATTCTCGAGGTCTGAAGAATTGAGTCA
NA3B.HindIIIs	GAAAGCTTATGAATCCACAGATCAGAAAT
NA3B.XhoIas	TCGAGCCAGGTATCTGAGAATCTC
CA3B.HindIIIs	GAAAGCTTATGGATCCAGACACATTCACTTTC
CA3B.XhoIas	TCGAGCGTTCCCTGATTCTGGAGAATA

3.1.2.1.2 Usmerjena mutageneza

Ob preverjanju nukleotidnega zaporedja plazmidov za izražanje zapisov za proteine mA3, hA3C, hA3G, hA3F in hA1 smo opazili premik bralnega okvirja, ki bi nam onemogočal izražanje proteinske oznake myc. Zato smo z uporabo začetnih oligonukleotidov mutAs in mutAs na mutiranih mestih v plazmidu s pomočjo kompleta QuickChange II Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene) izvedli usmerjeno mutagenezo, ki nam je omogočila izražanje oznake myc. S pomočjo usmerjene mutageneze smo izdelali tudi encimske mutante proteinov hA3A in hA3B, testirane v naši raziskavi. Za mutagenezo ustreznih aminokislinskih ostankov proteina hA3A smo uporabili naslednje pare začetnih oligonukleotidov: A3A.E72Af/A3A.E72Ar, A3A.CC101.106AAf/A3A.CC101.106AAr in že prej opisane A3AF75Ls/A3AF75Las ter A3A F95Ls/A3AF95Las (Narvaiza in sod., 2009). Tako smo iz plazmida pcDNA6.2hA3A.HA dobili plazmide pcDNA6.2hA3A.E72A.HA, pcDNA6.2hA3A.CC101.106AA.HA, pcDNA6.2hA3A.ECC72,101,106AAA.HA, pcDNA6.2hA3A.F75L.HA in pcDNA6.2hA3A.F95L.HA. Zapise za protein hA3B in njegovo delecijsko mutanto hNA3B smo z usmerjeno mutagenezo mutirali s paroma začetnih oligonukleotidov A3B.E68Qs/A3B.E68Qas in A3B.E255Qs/A3B.E255Qas, da smo dobili plazmide pcDNA6.2NA3B.E68Q.myc, pcDNA6.2A3B.E68Q.HA in pcDNA6.2A3B.E255Q.HA. Začetni oligonukleotidi, uporabljeni za usmerjeno mutagenezo, so navedeni v preglednici 2.

Preglednica 2: Seznam začetnih oligonukleotidov, uporabljenih pri usmerjeni mutagenezi
Table 2: List of site-directed mutagenesis primers

Ime	Nukleotidno zaporedje (5' proti 3')
mutAs	ATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTGGGTACCCATTGAAC
mutAas	GTTCGAATGGGTGACCCGAGCGGCCACTGTGCTGGAT
A3A.E72Af	GGCCGCCATCGGGCCTGCCTTCTTG
A3A.E72Ar	CAAGAACGCGCAGCGCCCATGGCGGCC
A3A.CC101.106AAf	CCTGGAGCCCCGCCTTCTCCTGGGGCGCTGCCGGGAAGTG
A3A.CC101.106AAr	ACTTCCCCGGCAGCGCCCCAGGGAGAACGGGGCTCCAGGA
A3A F75Ls	GGAACCAGGTCCAATAAGCGCAGCTCCGCATGG
A3A F75Las	CCATGCGGAGCTCGCTTATTGGACCTGGTTCC
A3A F95Ls	GGCTCCAGGAGATTAACCAAGTGACCTGTAG
A3A F95Las	CTACAGGGTCACTTGGTTAACCTCCTGGAGCC
A3B.E68Qs	AAGCCTCAGTACCAACGCACAAATGTGCTTCCTC
A3B.E68Qas	GAGGAAGCACATTGTGCGTGGTACTGAGGCTT
A3B.E255Qs	GGCTTTACGGCCGCCATGCGCAGCTGCCTTCTG
A3B.E255Qas	CAAGAACGCGCAGCTCGCATGGCGGCCAAAAGCC

3.1.2.1.3 Tehnologija kloniranja Gateway

Metoda prečnega povezovanja in imunoprecipitacije (CLIP), ki smo jo v sodelovanju z laboratorijem dr. Jerneja Uleta (Cambridge, Velika Britanija) uporabili pri preučevanju vezave med proteini A3 in RNA, je bila optimizirana za protitelesa proti zelenemu fluorescentnemu proteinu GFP. Predvsem zato in pa zaradi enostavne fluorescenčne detekcije izraženega proteina smo s tehnologijo kloniranja Gateway pripravili plazmid z zapisom za protein hA3A, ki je preko petih povezovalnih glicinov označen s proteinom GFP. Najprej smo pomnožili zapis za protein hA3A iz plazmida pcDNA6.2hA3A.HA z začetnima oligonukleotidoma A3AattB1s in A3AGlyGFP, zapis za protein GFP pa iz izhodiščnega plazmida pEGFP-N2 (Takara Bio, Japonska) z začetnima oligonukleotidoma GFP Gly in GFP. Tako smo dobili fragmenta s komplementarnimi konci, ki so drug drugemu predstavljeni začetni oligonukleotidi. Združili smo ju v reakciji PCR s podaljševanjem prekritja brez dodanih začetnih oligonukleotidov. Rekombinacijska mesta za vstavljanje v donorski plazmid pDONR 221 (Life Technologies, ZDA) smo fragmentu hA3AGFP dodali s pomnoževanjem z začetnima oligonukleotidoma A3AattB1s in GFPattB2as, nato pa rekombinacijo fragmenta v plazmid izvedli s pomočjo rekombinaze BP iz kompleta Gateway BP Clonase II Enzyme mix (Life Technologies, ZDA) in dobili plazmid hA3AGFPpDONR221. Fragment hA3AGFP smo v sesalski ekspresijski plazmid 221 pCS 3MT DEST z identifikacijsko številko 13070 (Addgene, ZDA) prestavili s pomočjo rekombinaze LR iz kompleta Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Life Technologies, ZDA) in tako dobili plazmid hA3AGFPpc2, v katerem je izražanje zapisa za protein podobno kot v plazmidu pcDNA6.2 pod kontrolo promotorja CMV. Plazmid pCS2 brez zapisa za citotoksični protein CcdB, ki smo ga v testu retrotranspozicije uporabili kot kontrolo, je bil darilo prof. Levkowitz (Weizmann Institute of Science,

Izrael). Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri kloniranju s pomočjo tehnologije Gateway, so navedeni v preglednici 3.

Preglednica 3: Seznam začetnih oligonukleotidov, uporabljenih pri kloniranju s tehnologijo Gateway

Table 3: List of Gateway cloning primers

Ime	Nukleotidno zaporedje (5' proti 3')
GFPGlyf	GGCGGAGGTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAG
GFPprev	CTTGTACAGCTCGTCCATGCC
A3AGlyGFPprev	CTCGCCCTTGCTCACCATTCACCACCTCCGCCGTTCCCTGATTCTGGAG
A3AattB1s	GGGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAGCCAGCCCAGCA
GFPattB2as	GGGGACCACTTGTACAAGAAAGCTGGTGTCACTTGTACAGCTCGTCCA

3.1.3 Namnoževanje in izolacija plazmidne DNA

3.1.3.1 Bakterijski sevi *E. coli*

Za kloniranje in namnoževanje plazmidov smo večinoma uporabljali kemijsko kompetentne celice *Escherichia coli* (*E. coli*) seva DH5 α (Subcloning Efficiency DH5 α (Life Technologies, ZDA)), ki je zaradi zmanjšane nukleazne aktivnosti primeren za vzdrževanje in izolacijo transformirane tuje DNA. Njegov genotip je F-φ80lacZΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ*. Pri kloniranju s tehnologijo Gateway smo za namnoževanje plazmidov pDONR 221 in 221 pCS 3MT DEST, ki kodirata citotoksični selekcijski protein CcdB, uporabili celice *E. coli* seva Library Efficiency DB3.1 Competent Cells (Life Technologies, ZDA), ki so na protein CcdB zaradi mutacije v genu za girazo (*gyrA462*) neobčutljive. Njihov genotip je F-*gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB⁻, mB⁻) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1*. Pri transformaciji in gojenju uporabljenih celic smo upoštevali navodila proizvajalcev ter splošna navodila za sterilno delo.

3.1.3.2 Bakterijska gojišča

Bakterije smo gojili v avtoklaviranem tekočem gojišču LB (angl. lysogeny broth), sestavljenem iz 1-odstotnega proteinskega hidrolizata, 0,5-odstotnega kvasnega ekstrakta in 1-odstotnega NaCl, ali na trdnem gojišču LB enake sestave, ki smo mu dodali še agar do končne 2-odstotne koncentracije. Ob izvajanju selekcije je bil gojišču dodan še antibiotik ampicilin v končni koncentraciji 100 µg/ml ali kanamicin (50 µg/ml). Bakterije so rasle preko noči pri temperaturi 37 °C.

3.1.3.3 Izolacija plazmidne DNA iz prekonočnih kultur *E. coli*

Za izolacijo plazmidov iz prekonočnih kultur smo uporabljali komplete proizvajalca Qiagen iz Nemčije. Po njegovih navodilih smo za izolacijo manjših količin plazmidne

DNA (do 20 µg) uporabljali komplet QIAprep Spin Miniprep Kit, večje količine plazmida (do 100 µg) pa smo izolirali s kompletom QIAprep Spin Midiprep Kit.

3.1.3.4 Trajne kulture bakterijskih celic

Za pripravo trajnih kultur transformiranih bakterijskih celic smo kolonije z agarnih plošč vceplili v tekoče gojišče LB z ustreznim antibiotikom in jih gojili preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo v zamrzovalni steklenički kulturi dodali avtoklaviran 70-odstotni glicerol do končne 21-odstotne koncentracije, in celice shranili pri -80 °C.

3.2 IN VITRO EKSPERIMENTI NA SESALSKEM MODELU

3.2.1 Uporabljene sesalske celice

V naših *in vitro* eksperimentih z sesalskimi ekspresijskimi plazmidi smo kot model človeške oz. sesalske celice uporabljali dve za gojenje enostavni, hitro rastoči, za transfekcijo dovezetni in najpogosteje uporabljeni nesmrtni humani celični liniji, HeLa in HEK293T. Celice HeLa prvotno izvirajo iz tumorskega vzorca celic agresivnega raka materničnega vratu, odvzetega pacientki Henrietti Lacks leta 1951 (Scherer in sod., 1953). Celična linija HeLa, ki smo jo uporabili pri večini naših eksperimentov, je bila darilo dr. Morana (Moran in sod., 1996). Za potrjevanje prehodnega izražanja zapisov za proteine AID/APOBEC iz sesalskih ekspresijskih plazmidov smo uporabljali celično linijo HEK293T. Celice HEK293T izvirajo iz nesmrte linije humanih embrionalnih ledvičnih celic HEK293 (angl. human embryonic kidney cells (HEK)) (Graham in sod., 1977), in stabilno izražajo veliki T-antigen virusa SV40, ki ekspresijskim vektorjem z ojačevalnim zaporedjem SV40 omogoča podvojevanje v transficiranih celicah, s tem pa tudi povečano in daljšo biosintezo proteinov.

3.2.1.1 Gojenje, presajanje in vzdrževanje človeških celičnih kultur HeLa in HEK 293T

Celice HeLa in HEK293T smo po odmrzovanju gojili na 10-cm ploščah pri 37 °C v atmosferi s 5-odstotno vsebnostjo CO₂ v gojišču DMEM (angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) z dodanim glutamatom in indikatorjem pH fenol rdeče (Life Technologies, ZDA). Gojišču smo dodali še antibiotika penicilin in streptomycin (Life Technologies, ZDA) v končni koncentraciji 100 µg/ml, vire proteinov, lipidov in rastnih dejavnikov pa smo zagotovili z dodatkom seruma telečjega zarodka južnoameriškega izvora (angl. fetal bovine serum (FBS)) (Life Technologies, ZDA) do 10-odstotne končne koncentracije. Ob izvajanju testa retrotranspozicije smo FBS južnoameriškega izvora v gojišču zamenjali za FBS iz ameriškega izvora (Life Technologies, ZDA), ker je retrotranspozicija v prisotnosti tega seruma pogostejša (osebna komunikacija z dr. Moranom). Celice smo precepljali vsake 3 do 4 dni, ob doseženi konfluentnosti, z uporabo

raztopine rekombinantnega tripsina Tryple Select (Life Technologies, ZDA). Najprej smo celicam odstranili staro gojišče in jih sprali s fosfatnim pufrom z NaCl (PBS) brez dodanega kalcija in magnezija (Life Technologies, ZDA), nato pa celične povezave ter povezave med celicami in podlago prekinili z dodatkom tripsina. Delovanje tripsina smo zaustavili z dodatkom gojišča, v katerem smo celice resuspendirali, in jih v razmerju 1:10 prenesli v sveže gojišče na novi plošči. Da bi celice ohranili čim bolj podobne, smo jih ob doseženi 80-odstotni konfluentnosti redno zamrzovali v mešanici kompletnegra gojišča z 10-odstotnim DMSO (Thermo Fisher Scientific, ZDA), ter zamrzovalne stekleničke s celicami hranili v tekočem dušiku.

3.2.1.2 Prehodna transfekcija človeških celičnih kultur HeLa in HEK293T

Plazmidno DNA smo v celice vnesli s pomočjo transfekcije. Dan pred izvedbo transfekcije smo v vsako jamico plošče s 6 jamicami nacepili po 2×10^5 celic. Če smo transfekcijo izvajali na 10-centimetrske ploščah, smo nacepljali po $1,6 \times 10^6$ celic. Po 24-urni inkubaciji smo ustrezno količino plazmidne DNA v celice vnesli z uporabo transfekcijskega reagenta Fugene 6 ali X-tremeGENE 9 (Roche, Švica) po navodilih proizvajalca. Celice smo nato gojili in tretirali v odvisnosti od eksperimenta, kot je opisano spodaj in na sliki 12.

3.2.2 Imunološko potrjevanje izražanja zapisov za proteine po prenosu western

Po uspešni pripravi plazmidov z zapisi za proteine AID/APOBEC smo njihovo izražanje v sesalskih celicah potrdili z metodo prenosa western. In sicer smo z 1 µg plazmida z zapisom za protein AID/APOBEC transficirali celice HEK293T, kjer se je protein z oznako HA, myc, V5 ali GFP prehodno sintetiziral. Po dveh dneh inkubacije smo celice poželi in jih inkubirali v pufru za lizo celic (1 % NP-40, 0,1 % SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6) z dodano mešanico inhibitorjev proteinaz (Roche, Švica) v končni koncentraciji 1 µl/ml 40 min pri 4 °C ob občasnem stresanju. Proteine smo po ločevanju po velikosti pod denaturirajočimi in reducirajočimi pogojih v 12-odstotnem poliakrilamidnem gelu (Thermo Fisher Scientific, ZDA) prenesli na nitrocelulozno membrano (Millipore, ZDA) z metodo prenosa western. Membrano z vezanimi proteini smo 1 uro blokirali v 5-odstotni raztopini posnetega mleka v pufru PBS z NaCl, nato pa jo preko noči inkubirali v raztopini primarnih protiteles (preglednica 4) v 5-odstotnem posnetem mleku v pufru PBS z NaCl. Po prekonočni inkubaciji smo nespecifično vezana protitelesa odstranili s trikratnim 15-minutnim spiranjem membrane v 0,05-odstotni raztopini detergenta Tween 20 v pufru PBS z NaCl. Nato smo membrano inkubirali v raztopini 5-odstotnega posnetega mleka v pufru PBS z NaCl z dodanimi sekundarnimi protitelesi s konjugirano hrenovo peroksidazo (HRP) 1 uro pri sobni temperaturi. Nespecifično vezana sekundarna protitelesa smo odstranili s dvakratnim 15-minutnim spiranjem membrane v 0,05-odstotni raztopini detergenta Tween 20 v pufru PBS z NaCl. Na koncu smo membrano sprali še z pufrom PBS z NaCl brez detergenta, prisotnost proteinov pa zaznali z dodatkom reagenta

ECL po navodilih proizvajalca Thermo Fisher Scientific (ZDA). Za kontrolo količine nanesenega vzorca na gel smo uporabljali protitelesa proti hišnemu proteinu GAPDH.

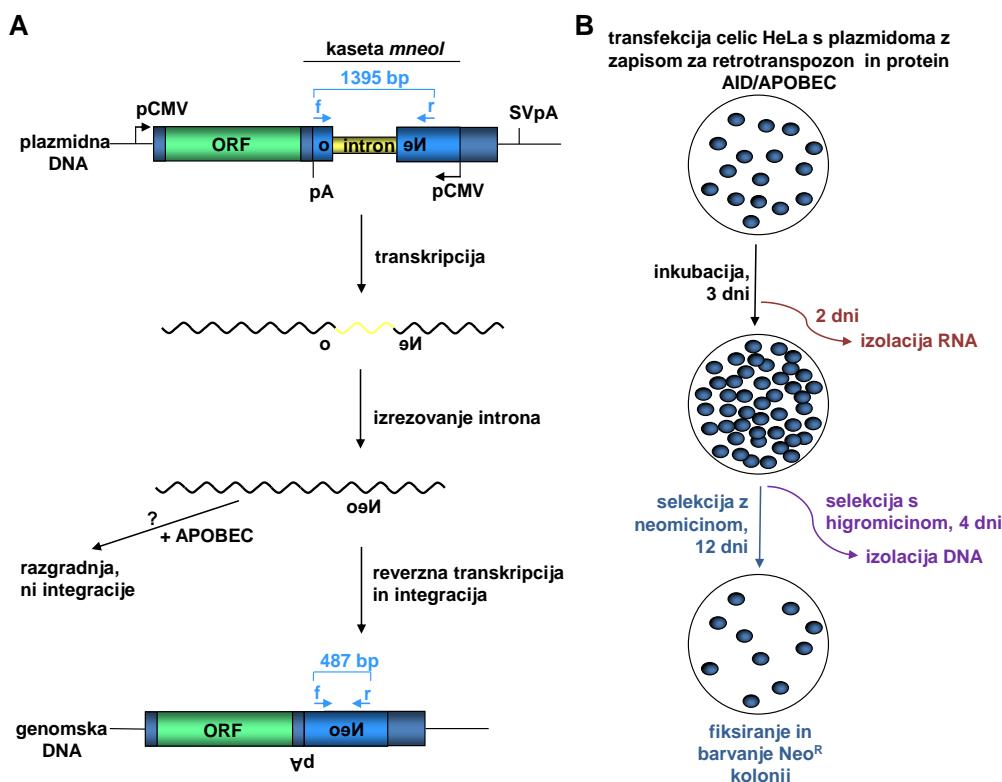
Preglednica 4: Seznam protiteles, uporabljenih v naši raziskavi

Tabel 4: List of antibodies, used in this study

Protitelo	Redčitev	Proizvajalec
Prim. mišja monoklonska IgM proti HA	1:5000	Life Technologies, ZDA
Prim. mišja monoklonska IgM proti myc	1:5000	Life Technologies, ZDA
Prim. mišja monoklonska IgM proti V5	1:5000	Life Technologies, ZDA
Prim. mišja monoklonska IgM proti GAPDH	1:5000	Life technologies, ZDA
Prim. kunčja poliklonska protitelesa proti GFP	1:5000	SantaCruz, ZDA
Sek. kozja protimišja IgG, konjugirana s HRP	1:10000	Jackson ImmunoResearch, ZDA
Sek. kozja protikunčja IgG, konjugirana s HRP	1:10000	Jackson ImmunoResearch, ZDA

3.2.3 Testiranje učinkov proteinov AID/APOBEC na retrotranspozone

Kot je opisano na sliki 12, smo učinke proteinov AID/APOBEC na retrotranspozone preučili iz različnih vidikov.



Slika 12: Potek eksperimentov

(A) Shema testa retrotranspozicije *in vitro* z retrotranspozonom, označenim z markerjem *neo* (Sugano et al., 2006). Plazmid z retrotranspozonom je opisan na sliki 10. (B) Časovna shema eksperimentov.

Figure 12: Experiments representation

Schematic representation of *in vitro* retrotransposition test with *neo*-marked retrotransposon (Sugano et al., 2006). Retrotransposon plasmid is depicted in figure 10. (B) Experimental time scale.

Delovanje proteinov AID/APOBEC in vlogo encimske aktivnosti pri inhibiciji retrotranspozicije različnih retrotranspozonov smo določili s pomočjo testa retrotranspozicije. Z analizami izolirane celične DNA in RNA smo preučili, ali proteini AID/APOBEC inhibirajo retrotranspozicijo preko zmanjševanja relativnega števila retrotranspozonske DNA ali RNA, oziroma preko povzročanja hipermutacij G v A v novi retrotranspozonski DNA. Natančneje so omenjene metode opisane v nadaljevanju.

3.2.3.1 Test retrotranspozicije *in vitro*

Test retrotranspozicije nam je omogočil spremljanje vpliva proteinov AID/APOBEC in njihovih encimskih mutant na učinkovitost retrotranspozicije našega modelnega retrotranspozona ZfL2-2 in ostalih preučevanih retrotranspozonov, navedenih v točki 3.1.1. Test je razvil dr. Moran (Moran in sod., 1996), potek testa pa je povzet na sliki 12. Testiram retrotranspozonom je bila na konec 3'-UTR dodana kaseta za odpornost proti neomicinu, vstavljena v obratni usmeritvi glede na retrotranspozon. Nukleotidno zaporedje, ki kodira neomicinsko fosfotransferazo, je prekinjeno z intronom 2 iz človeškega gena za γ -globin. Šele po transkripciji in rezovanju introna, čemur sledi reverzna transkripcija in integracija retrotranspozona na novo mesto v genomu, se lahko izrazi odpornost proti neomicinu pod kontrolo promotorja CMV, ki uravnava tudi retrotranspozon. Test retrotranspozicije smo izvajali v celicah HeLa. Nacepili smo jih 1 dan pred transfekcijo, kot je opisano v točki 3.2.1.2. Po 24-urni inkubaciji smo jih transficirali z 1 μ g plazmida s humanim retrotranspozonom L1 (Moran in sod., 1996), retrotranspozonom ZfL2-2 ribe cebrice (Sugano in sod., 2006), ali retrotranspozonom UnaL2 (pI-29) iz jegulje (Kajikawa in Okada, 2002) ter 1 μ g plazmida z zapisom za protein AID/APOBEC, ali s praznim vektorjem (pcDNA6.2). Test retrotranspozicije z retrotranspozonom ZfL2-1 (Sugano in sod., 2006) smo zaradi njegove manjše retrotranspozicijske učinkovitosti izvajali na 10-centimeterskih ploščah in z 2,5-kratno količino transficiranih plazmidov. Kadar smo izvajali od doze proteina AID/APOBEC odvisen test retrotranspozicije, smo uporabili od 0,01 do 2 μ g plazmida z zapisom za protein AID/APOBEC. Kot ponazarja slika 12, smo dva dni po transfekciji celice razdelili na 3 dele. Iz prve tretjine smo izolirali celično RNA (točka 3.2.3.6), drugi dve tretjini pa smo za nadaljnje gojenje nacepili na nove 10-cm plošče za izolacijo celične DNA (točka 3.2.3.2) in nadaljevanje testa retrotranspozicije. Te celice smo za 12 dni izpostavili selekciji z antibiotikom G418 (500 μ g/ml) (Life Technologies, ZDA), ki je omogočila rast in preživetje samo celicam, pri katerih je prišlo do uspešne in pravilne integracije retrotranspozona v genom. Rezultat testa retrotranspozicije so torej proti neomicinu odporne kolonije, ki smo jih fiksirali z metanolom in pobarvali z barvilkom TrypanBlue. Kolonije smo nato prešeli in izračunali učinkovitost retrotranspozicije testiranih retrotranspozonov v prisotnosti različnih proteinov AID/APOBEC. Pri izračunu učinkovitosti retrotranspozicije smo upoštevali, da je retrotranspozicija v prisotnosti praznega plazmida pcDNA6.2 100-odstotna. Vsak eksperiment smo izvedli v vsaj treh ponovitvah, statistično pa smo rezultate obdelali s pomočjo *t*-testa. Kot negativno kontrolo

smo pri testu retrotranspozicije izvedli transfekcijo celic HeLa samo s plazmidom z zapisom za protein AID/APOBEC, ali pa s transpozicijsko neaktivnimi retrotranspozonskimi plazmidi, opisanimi v točki 3.1.1, in ustreznim plazmidom z zapisom za protein AID/APOBEC. Po selekciji z neomicinom v skladu s pričakovanji nismo dobili kolonij.

3.2.3.2 Izolacija celične DNA in analiza novih kopij DNA retrotranspozonov L2 in L1

Vpliv proteinov AID/APOBEC na relativno število in nukleotidna zaporedja novih kopij retrotranspozonske DNA smo določali z analizo izolirane celične DNA. Tri dni po transfekciji smo celice HeLa izpostavili selekciji s higromicinom (Life Technologies, ZDA) v končni koncentraciji 200 µg/ml, ki je trajala 4 dni. Nato smo iz transficiranih celic izolirali celotno celično DNA s kompletom DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Prisotno RNA smo razgradili z dodatkom RNaze A iz govejega pankreasa (Roche, Švica) v končni koncentraciji 2 µg/µl. Vpliv proteinov AID/APOBEC na relativno število kopij plazmidne DNA smo določali v celični DNA, ki smo jo izolirali 2 dni po transfekciji.

3.2.3.3 Določanje relativnega števila novih kopij DNA retrotranspozonov L2 in L1

Vpliv proteinov AID/APOBEC na relativno število novih kopij DNA retrotranspozonov hL1 in ZfL2-2 v izolirani celični DNA smo določali s pomočjo reakcije PCR v realnem času (qPCR) s kemizmom SYBR Green. Pomnoževali smo fragment *neo* z izrezanim γ-intronom, dolg 117 bp. Za pomnoževanje smo uporabili notranji začetni oligonukleotid Neo210s in drugi protismerni Neo1228as, ki se je prilegal na konec prvega in začetek drugega eksona gena *neo*. Tako smo pomnožili samo fragmente *neo* brez introna, ki so prisotni le v novih kopijah v genom integriranih retrotranspozonov ter v njihovi cDNA. Za normalizacijo frekvence retrotranspozicije v vsakem posameznem vzorcu smo uporabili frekvenco dveh referenčnih genov, ki sta v genomu v eni sami kopiji, in sicer gen za superoksid dismutazo (*SOD2*) in gen za globin beta (*HBB*) (Kersting in sod., 2004). Vse reakcijske mešanice so v končnem volumnu 10 µl vsebovale že pripravljeno mešanico za PCR z zelenim barvilm SYBR Green iz kompleta FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Švica), oba začetna oligonukleotida v končni koncentraciji 500 nM, in 2,5 ng izolirane celične DNA. Eksperiment qPCR smo izvedli z napravo LightCycler Nano (Roche, Švica) pri temperturnih pogojih, prikazanih v preglednici 5.

Preglednica 5: Pogoji reakcije qPCR

Table 5: qPCR conditions

T (°C)	Čas (s)	Hitrost segrevanja (°C/s)	Št. ciklov
95	600	5	45
95	15	5	
60	12	4	
72	15	5	
72	120	5	1

Talilno krivuljo smo nato pridobili s segrevanjem vzorca s 50 na 95 °C pri hitrosti 0,1 °C/s, s čimer smo po koncu vsake izvedene reakcije qPCR preverili specifičnost pomnoževanja vsakega para začetnih oligonukleotidov. Dodatno smo odsotnost nespecifičnih pomnožkov potrdili z analizo reakcijskih mešanic z agarozno gelsko elektroforezo. Za določevanje učinkovitosti in specifičnosti pomnoževanja s posameznim parom začetnih oligonukleotidov in za korekcijo variabilnosti med posameznimi reakcijami qPCR smo uporabili kalibratorsko genomsko DNA, izolirano iz celic HeLa, ki so bile transficirane s plazmidom z retrotranspozonom in praznim plazmidom pcDNA6.2. Za relativno kvantifikacijo novih kopij retrotranspozonske DNA s pomočjo obeh referenčnih genov (*HBB* in *SOD2*) smo uporabili metodo, ki upošteva korekcijo učinkovitosti podvojevanja, stopnjevanje napake in normalizacijo (Vandesompele in sod., 2002). Rezultate smo predstavili relativno na frekvenco novih kopij retrotranspozonske DNA, določeno v vzorcu DNA iz celic, transficiranih s praznim vektorjem in vektorjem z retrotranspozonom. Nukleotidna zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov so v preglednici 6.

Preglednica 6: Seznam začetnih oligonukleotidov za določanje relativnega števila novih kopij retrotranspozonske DNA s qPCR

Table 6: List of primers used for qPCR quantification of relative number of novel retrotransposon DNA copies

Ime	Nukleotidno zaporedje (5' proti 3')
Neo210s	CCCAATAGCAGCCAGTCCCTT
Neo1228as	TGAATGAGCTTTCAGGACGAGG
SOD2 F (Kersting in sod., 2004)	GGAGAAGCTGACGGCTGC
SOD2 R (Kersting in sod., 2004)	CCTTATTGAAACCAAGCCAACC
HBB F (Kersting in sod., 2004)	GTGAAGGCTCATGGCAAGAAAG
HBB R (Kersting in sod., 2004)	CAGCTCACTCAGTGTGGCAAAG

3.2.3.4 Določanje vpliva proteinov AID/APOBEC na relativno število kopij plazmidne DNA

Učinek proteinov na relativno število kopij plazmidne DNA smo preverili z izvedbo metode qPCR. Celice smo transficirali s plazmidoma z zapisom za retrotranspozon in protein APOBEC, kot je opisano pri točki 3.2.3.1. Po 48 urah smo izolirali celično DNA in učinek proteinov APOBEC na transficirano plazmidno DNA določili s pomnoževanjem fragmentov na posameznih plazmidih. Relativno število kopij plazmida z zapisom za

retrotranspozon smo določili s pomnoževanjem 109 bp dolgega fragmenta z začetnima oligonukleotidoma Neo673F in Int738R, ki sta se prilegala na zapis za retrotranspozon z intronom, prisotnim samo na plazmidni DNA. Relativno število kopij plazmida pcDNA6.2, ki nosi zapis za protein APOBEC, pa smo določili s paromo začetnih oligonukleotidov Blas149F/Blas248R, ki pomnožujeta 100 bp dolg del zapisa za odpornosti proti blasticidinu. V posamezni reakciji smo uporabili 0,025 ng celotne celične DNA, reakcijo, normalizacijo in analizo rezultatov pa smo izvedli kot je opisano pri točki 3.2.3.3. Nukleotidna zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov so v preglednicah 6 in 7.

Preglednica 7: Seznam začetnih oligonukleotidov za določanje relativnega števila kopij plazmidne DNA s qPCR

Table 7: List of primers used for qPCR quantification of relative number of plasmid DNA copies

Ime	Nukleotidno zaporedje (5' proti 3')
Neo673F	CTTCAGTGACAAACGTGAGCAC
Int782R	CAGTGCTGAAACATCTCCTGGAC
Blas149F	GGGACCTTGTGCAGAACTCGT
Blas248R	GATGCCCTGTTCTCATTTCCG

3.2.3.5 Analiza nukleotidnih zaporedij novih kopij DNA retrotranspozonov L2 in L1

Proteini APOBEC so citidin deaminaze. Ali retrotranspozicijo preprečujejo z deaminacijo v nukleotidnem zaporedju retrotranspozona, smo preučevali s sekvenciranjem novih kopij retrotranspozonske DNA v izolirani celični DNA. Integrirato izolirane DNA smo preverili s pomnoževanjem gena za fosfoglicerat kinazo *PGK* ((angl. protein kinase, cGMP-dependent, type I); uradni simbol *PRKG1*) z začetnima oligonukleotidoma PGKf in PGKr. S parom začetnih oligonukleotidov neo437s/1808as smo iz izolirane DNA z DNA-polimerazo z visoko natančnostjo pomnoževanja iz kompleta Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies, ZDA) po navodilih proizvajalca pomnožili 487 baznih parov dolge fragmente *neo* brez introna, ki smo jih od 1395 bp dolgih fragmentov s še neizrezanim intronom ločili na 1-odstotnem agaroznem gelu. Fragmenti ustrezne velikosti (487 bp) smo izrezali, jih očistili in jih vstavili v vektor pCR2.1 iz kompleta TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Life Technologies, ZDA) preko 3'-A-koncev, ki jih je dodala uporabljeni DNA-polimeraza. Pri kloniranju fragmentov s tehnologijo komplementarnih koncev TA smo uporabili kompetentne celice seva DH5 α (Life Technologies, ZDA), opisane v točki 3.1.3.1. Klone z uspešno vstavljenim insertom *neo* smo identificirali na osnovi bele barve s pomočjo modro-belega testa, kjer smo na plošči LB z ampicilinom razmazali še indikator X-gal do končne koncentracije 40 μ g/ml, dodatno pa prisotnost inserta *neo* potrdili z metodo PCR na osnovi ene same kolonije in z uporabo para začetnih oligonukleotidov neo437s/1808as. Iz vsaj petih posameznih klonov smo nato izolirali plazmid pCR2.1 z insertom *neo* in inserte sekvencirali z uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov pri podjetju Eurofins MWG Operon (Nemčija). Dobljena nukleotidna zaporedja smo poravnali in analizirali s programom Hypermute (Rose

in Korber, 2000), ki je bil posebej zasnovan za določanje mutacij G v A, značilnih za delovanje proteinov A3.

3.2.3.6 Izolacija in analiza RNA retrotranspozonov L2 in L1

Učinek proteinov AID/APOBEC na RNA retrotranspozonov ZfL2-2 in hL1 smo preverili z metodo qPCR. Osemnštirideset ur po transfekciji celic HeLa s plazmidoma z zapisom za retrotranspozon in protein APOBEC ali pa s praznim vektorjem kot kontrolo smo izolirali celotno celično RNA s pomočjo kompleta RNeasy Plus Minikit in po navodilih proizvajalca Qiagen (Nemčija). Vzorce izolirane RNA smo nato obdelali z DNazo I iz kompleta DNA-free Kit (Life Technologies, ZDA) in s tem odstranili morebitne sledove genomske DNA. Komplementarno DNA smo iz 1,25 µg posameznega vzorca RNA sintetizirali z reverzno transkriptazo iz kompleta Superscript Vilo cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, ZDA). Vzorce cDNA smo 4000-krat redčili in jih nato analizirali s qPCR. Kontaminacijo z DNA smo preverili v reakcijah z vzorci, ki smo jim dodali vse sestavine, potrebne za reverzno transkripcijo, razen reverzne transkriptaze, kontaminacijo izhodiščnih raztopin pa z izvedbo reakcij brez vzorca. Vzorce cDNA smo 4000-krat redčili in jih nato analizirali s qPCR. Relativno število kopij cDNA gena *neo* smo določali s pomnoževanjem s parom začetnih oligonukleotidov Neo673F/Int738R (preglednica 7). Dobljene vrednosti smo normalizirali na vrednost cDNA proteina GAPDH, pomnožene s parom začetnih oligonukleotidov GAPDHf/GAPDHr (preglednica 8). Reakcijski pogoji so navedeni pod točko 3.2.3.3.

Preglednica 8: Seznam začetnih oligonukleotidov za določanje relativnega števila kopij retrotranspozonske RNA s qPCR

Table 8: List of primers used for qPCR quantification of relative number of retrotransposon RNA copies

Ime	Nukleotidno zaporedje (5' proti 3')
GAPDHf	CAACGGATTTGGTCGTATTGG
GAPDHr	GCAACAATATCCACTTACCAGAGTTA

3.2.4 Epifluorescenčna mikroskopija

Celice HeLa smo nacepili na ploščo z 6 vdolbinicami, kot je opisano pod točko 3.2.1.2. Po 24 h smo jih transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za protein hA3AGFP in jih pustili rasti pri standardnih pogojih 48 h. Izražanje in funkcionalnost proteina hA3AGFP smo preverili z opazovanjem celic pod invertnim epifluorescenčnim mikroskopom Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Nemčija). Mikroskopske posnetke smo zajemali pod 200-kratno povečavo in z uporabo ekscitacijskega filtra 470/40 in emisijskega filtra 525/50, ter s programom AxioVision (Carl Zeiss, Nemčija).

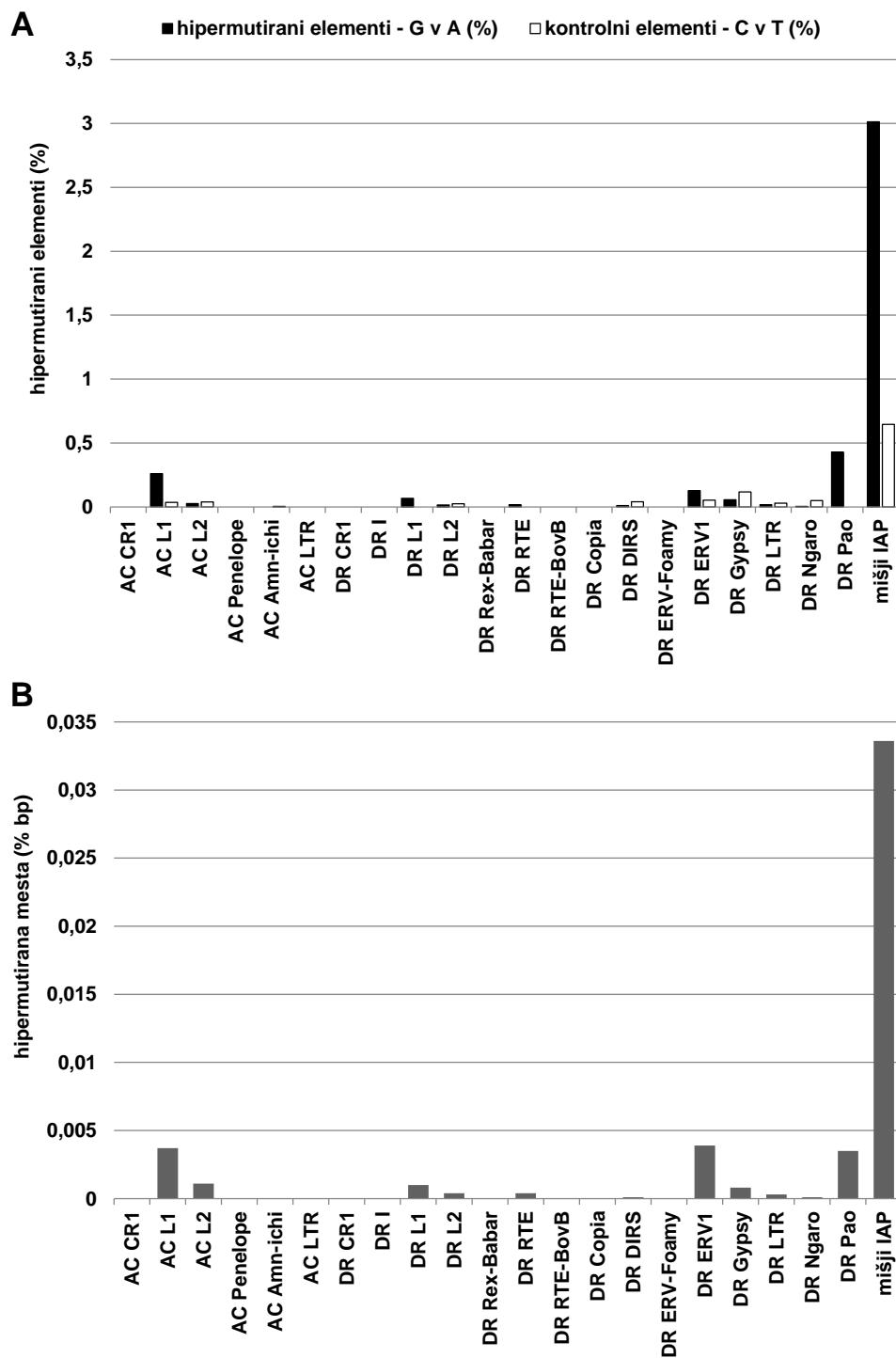
3.2.5 Priprava celic HeLa za analizo interakcij med proteini hA3 in RNA z metodo prečnega povezovanja in koimunoprecipitacije (CLIP)

Interakcije med proteinom hA3A in RNA smo preučevali z metodo CLIP (angl. cross-linking and immunoprecipitation). V ta namen smo na 10-cm plošče nacepili po $1,6 \times 10^6$ celic HeLa, kot je opisano pri točki 3.2.1.2, in jih po 24-urni inkubaciji transficirali z $10 \mu\text{g}$ plazmida z zapisom za protein hA3AGFP ali GFP, za kontrolo pa brez plazmida. Celice smo gojili pri standardnih pogojih 48 h, nato pa jih tripsinizirali, sprali z pufrom PBS in jih v zamrzovalnih stekleničkah hitro zamrznili v tekočem dušiku. Nato smo jih na suhem ledu poslali na analizo v laboratorij dr. Uleta v Cambridge (Velika Britanija). Tam so metodo CLIP izvedli, kot je opisano (Ule in sod., 2005). Na kratko, celice so najprej izpostavili UV-svetlobi, zaradi česar med proteini in njihovimi vezavnimi RNA-partnerji v celici nastanejo kovalentne vezi. Celice so nato lizirali in lizate obdelali z DNazo I, ki razgradi DNA. Molekule RNA, ki niso bile prečno povezana na proteinske vezavne partnerje, so razgradili z dodatkom RNaze I v dveh različnih koncentracijah, visoki in nizki. Proteine so izolirali iz celičnih lizatov s koimunoprecipitacijo, med katero so RNA radioaktivno označili. Učinkovitost metode CLIP in specifičnost uporabljenih protiteles proti oznaki GFP so preverjali v kontrolnih vzorcih celic, iz katerih so izolirali RNA-vezavni, s proteinom GFP označen protein Cugbp2 (angl. CUG triplet repeat, RNA binding protein 2) (Hwang in sod., 1994), razgradnjo RNA v naših poslanih vzorcih pa izločili s koimunoprecipitacijo in dokazovanjem vezave RNA na RNA-vezavni protein hnRNPC (Konig in sod., 2010). Z vsemi izoliranimi kompleksi so na koncu izvedli SDS-PAGE in prenos western, nitrocelulozno membrano pa izpostavili rentgenskim žarkom in prisotnost radioaktivno označene RNA zaznavali na filmu. Različna velikost območij s pozitivnim signalom ob uporabi različnih koncentracij RNaze I nakazuje, da je signal res posledica prisotnosti kompleksa protein-RNA, ter omogoča določitev velikosti imunoprecipitiranega kompleksa. V vzorcih, obdelanih z višjo koncentracijo RNaze I, so namreč na imunoprecipitirane proteine vezane krajše RNA, zaradi česar kompleksi skozi elektroforezni gel potujejo manj difuzno.

4 REZULTATI

4.1 GENOMSKA ANALIZA NESESALSKIH VRETEŃČARSKIH GENOMOV

Dolgi skupki hipermutacij G v A, ki so prisotni v nukleotidnem zaporedjih številnih retroelementov v človeškem in mišjem genomu, kažejo na mutageno delovanje proteinov A3 na retroelemente v teh genomih (Carmi in sod., 2011). Ker so proteini AID/APOBEC prisotni tudi v nesalskih organizmih, nas je zanimalo, ali lahko odtise delovanja proteinov APOBEC najdemo tudi v genomih vretenčarjev, ki so se razvili pred sesalcji. V sodelovanju z našimi sodelavci z Univerze Bar-Ilan iz Izraela smo zato izvedli analizo sesalskih in nesalskih genomov (Lindič in sod. 2013). Po metodi, ki so jo razvili Carmi in sod. (2011), smo poravnali pare nukleotidnih zaporedij večine LTR-retrotranspozonov in ne-LTR-retrotranspozonov LINE v genomih ribe cebrice (DR) in zelenega kuščarja anoli (AC) in rezultate primerjali s tistimi, ki smo jih dobili pri analizi LTR-retrotranspozonov iz mišjega genoma. Iskali smo skupke zaporednih hipermutacij G v A v kodirajoči verigi retrotranspozonske DNA, ki nakazujejo preurejanje teh zaporedij s protein AID/APOBEC. Proteini AID/APOBEC namreč specifično preurejajo nekodirajočo verigo DNA retrotranspozona, ki nastane po reverzni transkripciji (slika 8). Mutacije C v U, ki ji proteini AID/APOBEC povzročijo, se nato v kodirajoči verigi retrotranspozona berejo kot G v A. Da bi izločili možnost, da so skupki hipermutacij G v A posledica naključne mutogeneze, smo kot kontrolo določali tudi število hipermutacij C v T, katerih frekvenca bi bila v primeru naključne mutogeneze podobna frekvenci mutacij G v A. Naša analiza je razkrila skupke zaporednih hipermutacij G v A v retrotranspozonih analiziranih nesalskih genomov (slika 13). Pogostost odkritih mutacij je bila primerljiva s hipermutacijami v ne-LTR-retrotranspozoni človeških in mišjih genomov (Carmi in sod., 2011; Lindič in sod., 2013). Frekvenca hipermutacij je bila najvišja v retrotranspozoni poddržine elementov LINE, in sicer v kuščarjevih elementih L1. Nasprotno je bila pogostost hipermutacij elementov L2 v nesalskih genomih zanemarljiva. Rezultati naše genomske analize so prvi dokaz mutacij G v A v DNA retrotranspozonov nesalskih genomov in odražajo encimsko delovanje citidin deaminaz.



Slika 13: In silico genomska analiza retroelementov v genomih zelenega kuščarja anoli (AC), ribe cebrike (DR) in miši

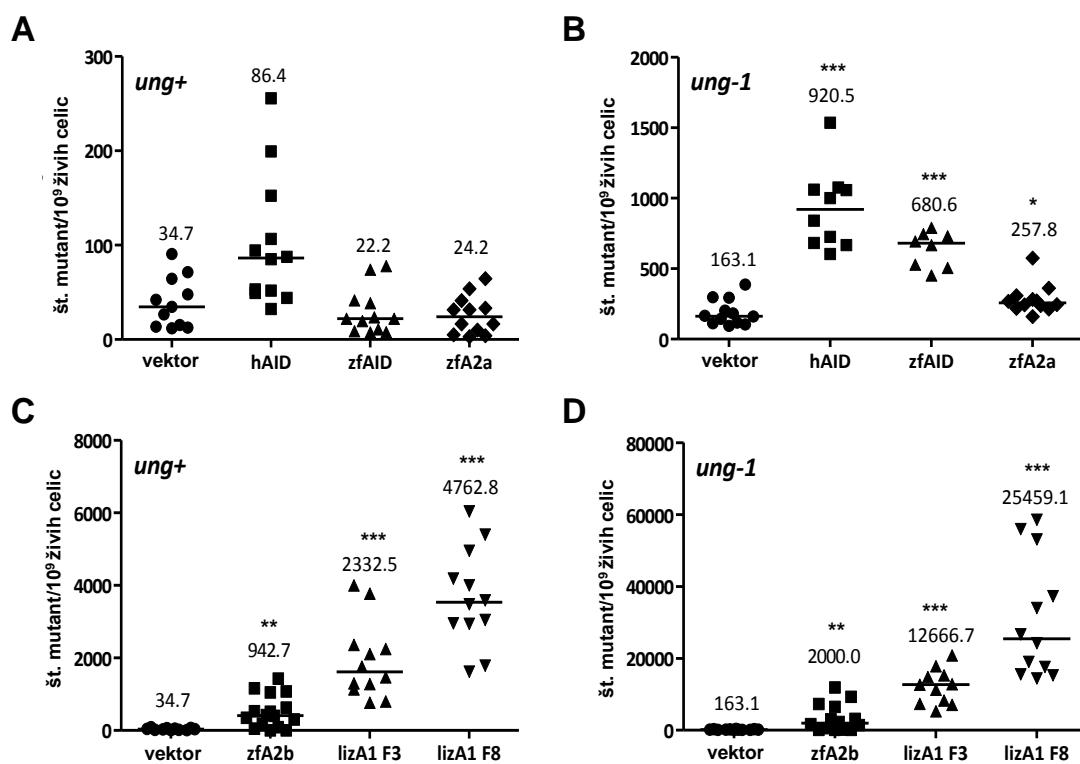
(A) Odstotek retroelementov v posamezni retrotranspozonski družini z identificiranimi hipermutacijami G v A. (B) Odstotek hipermutiranih mest pri posamezni družini. P-vrednost=1e-8, prag=8.

Figure 13: In silico genome analysis of retroelements present in green anole lizard (AC), zebrafish (DR) and mouse genome

(A) Percentage of edited elements with G-to-A clusters identified in each retrotransposon family. (B) Percentage of edited sites in each family. P-value=1e-8, Threshold=8.

4.2 TEST MUTAGENOSTI S PROTEINI AID/APOBEC

Citidin deaminazno aktivnost trenutno dostopnih proteinov AID/APOBEC, prisotnih v organizmih iz analiziranih nesesalskih genomov, smo v sodelovanju z dr. Maruško Budič preverili s testom mutagenosti v bakterijah *E. coli* (slika 14), kot je opisano v Lindič in sod. (2013). V bakterijah smo izrazili naslednje proteine: AID (zfAID), A2a (zfA2a) in A2b (zfA2b) iz ribe cebrice ter dve naravni varianti proteina A1a iz zelenega kuščarja anoli (lizA1aF3 in lizA1aF8). Za pozitivno kontrolo smo uporabili humani protein AID, za negativno pa prazen plazmid. Mutacije v genu za RNA-polimerazo B smo po izražanju proteinov AID/APOBEC v *E. coli* določili s štetjem proti rifampicinu odpornih kolonij (Severi in sod., 2011; Wang in sod., 2011) in določitvijo frekvence mutacij.



Slika 14: Testiranje mutagenosti različnih proteinov AID/APOBEC v bakteriji *E. coli*

(A, C) Frekvenca proti rifampicinu odpornih mutantov v kulturah seva *E. coli* KL16 (*ung⁺*) transformiranega s plazmidi z zapisi za proteine AID/APOBEC, ali s praznim vektorjem. Vsaka točka predstavlja frekvenco mutacij v posamezni prekonočni kulturi, z nakazano mediano. (B, D) Frekvence mutant v kulturah seva *E. coli* BW310 (*ung-1*) v prisotnosti AID/APOBEC ali praznega vektorja. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, enosmerna ANOVA z Bonferronijevo prilagoditvijo.

Figure 14: Results of *E. coli* mutator assay performed with various AID/APOBEC proteins

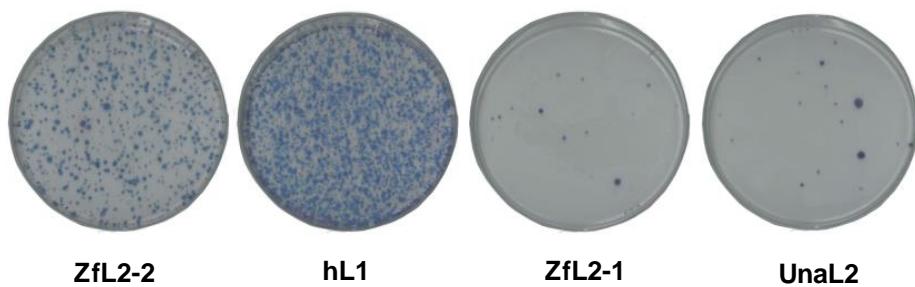
(A, C) Frequencies of Rif^R mutants in cultures of *E. coli* KL16 (*ung⁺*) carrying AID/APOBEC expression plasmids or the vector control. Each point represents the mutation frequency of an independent overnight culture. The median mutation frequencies are indicated. (B, D) Mutation frequencies *E. coli* BW310 (*ung-1*) cultures expressing AID/APOBEC or a vector control. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, one-way ANOVA with Bonferroni adjustment.

Pri bakterijah z izraženim proteinom A2b iz ribe cebrice smo zaznali 12-krat, pri proteinu AID iz ribe cebrice 5,6-krat in pri humanem proteinu AID 4-krat povečano frekvenco mutacij. Podobno mutageno aktivnost proteina AID iz ribe cebrice so opazili že MacDuff in sod. (2009). Najvišjo frekvenco mutacij sta povzročili dve naravni varianti kuščarjevega proteina A1a: 77-kratno povečanje smo zaznali v prisotnosti variante A1a F3 (R73K, Y116C), 156-kratno pa v prisotnosti variante A1a F8 (N53D). Frekvenca mutacij se je v odsotnosti uracil DNA-glikozilaze (UDG), encima, ki sodeluje pri popravljanju mutacij v genomske DNA, še povečala (slika 14, B in D). Naši rezultati potrjujejo, da so proteini A2b in AID iz ribe cebrice ter kuščarjeva proteina A1a F3 in A1a F8 močni mutatorji DNA in tako tudi potencialni preurejevalci analiziranih nesalskih genomov.

4.3 VPLIV PROTEINOV AID/APOBEC NA UČINKOVITOST RETROTRANSPOZICIJE

4.3.1 Učinkovitost retrotranspozicije elementov ZfL2-2, hL1, ZfL2-1 in UnaL2 v celicah HeLa

Vse retrotranspozone, ki smo jih uporabili v naši raziskavi in so opisani pod točko 3.1.1, smo najprej preizkusili v učinkovitosti retrotranspozicije v celični kulturi v odsotnosti proteinov AID/APOBEC. Kljub temu, da so bili vsi retrotranspozicijsko aktivni v celicah HeLa, smo v primerjavi z učinkovito retrotranspozicijo humanega elementa L1 (hL1) opazili nižjo osnovno raven retrotranspozicije elementa L2 iz ribe cebrice (ZfL2-2) in jegulje (UnaL2) (slika 15). Učinkovitost retrotranspozicije elementa UnaL2 je bila približno 20-krat nižja kot učinkovitost elementa ZfL2-2, najnižjo pa smo opazili pri elementu ZfL2-1, kar se sklada z že opaženim (Sugano in sod., 2006).



Slika 15: Prikaz rezultatov testiranja učinkovitosti retrotranspozicije z genom *neo* označenih retrotranspozonov v celicah HeLa

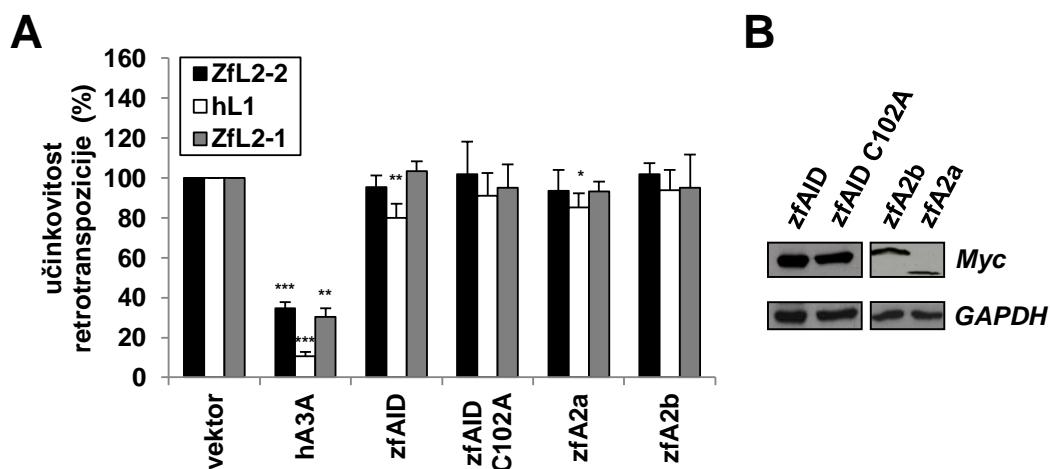
Število proti neomicinu odpornih kolonij odraža osnovno raven retrotranspozicije štirih različnih retrotranspozonov, testiranih v naši raziskavi.

Figure 15: Results of retrotransposition efficiency testing of *neo*-marked retrotransposons used in this study, in HeLa cells

The number of neomycin resistant colonies represents the basal retrotransposition rate of four different retrotransposons, tested in our study.

4.3.2 Učinek proteinov AID/APOBEC iz ribe cebrice na retrotranspozicijo elementov ZfL2-2, hL1 in ZfL2-1

Da bi ugotovili, ali lahko proteini AID/APOBEC, kodirani v genomu ribe cebrice, inhibirajo retrotranspozicijo, smo z njimi izvedli test retrotranspozicije, kot je prikazano na sliki 12. Na kratko, celice HeLa smo transficirali s plazmidi z zapisi za proteine zfA2a, zfA2b, zfAID ali z encimskim mutantom proteina zfAID (zfAID C102A) ter s predstavniki retrotranspozonskih kladov L1 in L2, in sicer z retrotranspozonom ribe cebrice ZfL2-2 in ZfL2-1 ter s človeškim retrotranspozonom hL1. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili humani protein A3A (hA3A), ki je učinkovito znižal retrotranspozicijo testiranih elementov L1 in L2, medtem ko je bil učinek proteinov AID/APOBEC iz ribe cebrice zanemarljiv (slika 16A). Izražanje zapisov za proteine iz transficiranih plazmidov smo potrdili v sesalskem celičnem modelu HEK293T (slika 16B).



Slika 16: Učinek proteinov AID/APOBEC iz ribe cebrice na retrotranspozicijo retrotranspozonov ZfL2-2, hL1 in ZfL2-1 v celicah HeLa

(A) Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon in z 1 µg plazmida z zapisom za proteine AID/APOBEC. Po selekciji z neomicinom smo proti neomicinu odporne kolonije fiksirali, pobarvali in prešteli, relativno učinkovitost retrotranspozicije pa izračunali glede na število kolonij, ki so zrastle v prisotnosti praznega plazmida (100-odstotna učinkovitost retrotranspozicije). Slika prikazuje povprečne vrednosti ± standardne deviacije (SD) za vsaj 3 neodvisne eksperimente. ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05, t-test. (B) Izražanje s proteinsko označo myc označenih proteinov iz ribe cebrice smo potrdili v celicah HEK293T, za kontrolo nanosa pa smo uporabili protitelesa proti proteinu GAPDH.

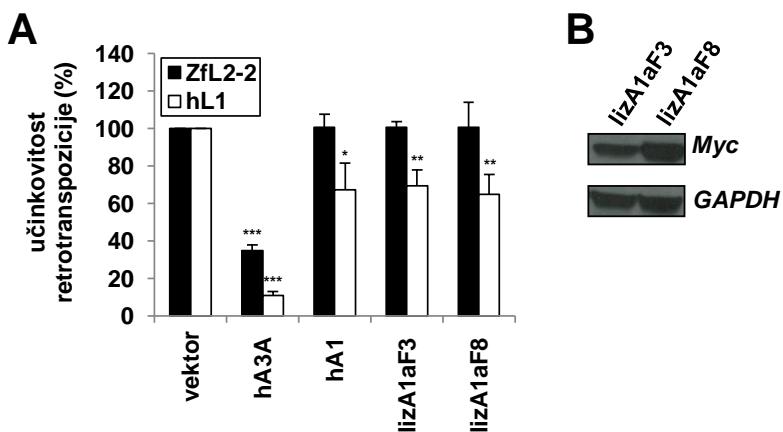
Figure 16: The effect of the zebrafish APOBEC proteins on the retrotransposition of ZfL2-2, hL1 and ZfL2-1 retrotransposons in HeLa cells

(A) HeLa cells were co-transfected with 1 µg of target retrotransposon plasmid and 1 µg of effector plasmids encoding AID/APOBEC protein. After G418 selection, *neo*-resistant colonies were fixed, stained and counted, and relative retrotransposition was calculated by setting the value for retrotransposon plasmid, co-transfected with an empty pcDNA6.2 vector, as 100 %. Data are the means ± standard deviations (SD) for at least three independent experiments. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, t-test. (B) Successful expression of myc epitope-tagged zebrafish proteins in mammalian cells was confirmed in the HEK293T model. GAPDH was used as a loading control.

Zanemarljivo majhen učinek na stopnjo retrotranspozicije retrotranspozona hL1 smo sicer opazili pri proteinu zfA2a. Prav tako nizek učinek na element hL1 smo zaznali pri proteinu zfAID, kar je že bilo opaženo, in sicer pri izvedbi testa retrotranspozicije s poročevalnim proteinom GFP v celicah HEK293T (MacDuff in sod., 2009). Encimski mutant proteina zfAID ni imel učinka na nobenega od testiranih retrotranspozonov. Naši rezultati nakazujejo, da imajo proteini AID/APOBEC iz ribe cebrike zanemarljiv učinek na retrotranspozicijo elementov ZfL2-2, hL1 in ZfL2-1 v celicah HeLa. V skladu s tem so predlagali druge fiziološke funkcije ribnih proteinov AID/APOBEC, kot je na primer aktivna demetilacija med embrionalnim in mišičnim razvojem (Rai in sod., 2008; Etard in sod., 2010; Vonica in sod., 2011).

4.3.3 Učinek kuščarjevega proteina A1 na retrotranspozicijo elementa hL1 in ZfL2-2

Glede na hipermutacije DNA, ki smo jih odkrili v kuščarjevem genomu, in visoko encimsko aktivnost njegovih proteinov A1 (Severi in sod., 2011; Lindič in sod., 2013), smo predvidevali, da kuščarjevi proteini A1 zavirajo retrotranspozicijo. Da bi preverili to hipotezo, smo dve v naravi prisotni izobliku kuščarjevega proteina A1a (F3 in F8) testirali v prisotnosti ne-LTR-retrotranspozonov hL1 in ZfL2-2 (slika 17). Za pozitivno kontrolo smo uporabili humana proteina A1 in A3A, za katera je bilo že dokazano, da inhibira element hL1 (Bogerd in sod., 2006a; Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006; Ikeda in sod., 2011). Opazili smo, da učinkovitost retrotranspozicije elementa hL1 v prisotnosti proteina lizA1aF3 pada na 80 odstotkov, v prisotnosti proteina lizA1aF8 pa celo na 60 odstotkov, in da je njun učinek na retrotranspozicijo elementa hL1 primerljiv z učinkom humanega proteina A1. V nasprotju z učinkom na element hL1 pa inhibitornega učinka testiranih proteinov A1 na ribji ZfL2-2 nismo zaznali. Naši rezultati nakazujejo, da proteini A1, tako kuščarjevi kot humani, na različne retrotranspozone LINE delujejo različno in da kuščarjev protein A1a zavira retrotranspozicijo elementa hL1 v celicah HeLa, kar nakazuje njegovo zaščitno vlogo proti retroelementom.



Slika 17: Učinek kuščarjevih in humanega proteina A1 na retrotranspozicijo retrotranspozonov ZfL2-2 in hL1

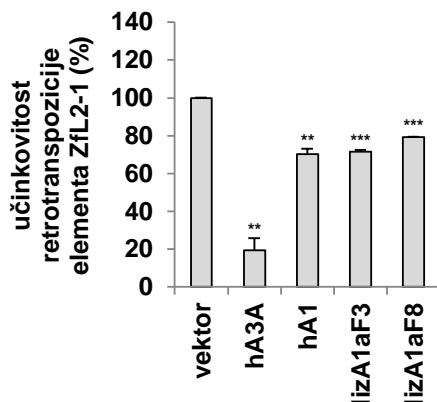
(A) Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon in z 1 µg plazmida z zapisom za proteine APOBEC. Test retrotranspozicije smo izvedli in rezultate obdelali kot je opisano pri sliki 16. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD za vsaj 3 neodvisne eksperimente. ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05, t-test. (B) Izražanje s proteinsko oznako myc označenih kuščarjevih proteinov smo potrdili v celicah HEK293T, za kontrolo nanosa pa smo uporabili protitelesa proti proteinu GAPDH.

Figure 17: The effect of lizard and human A1 proteins on the retrotransposition of ZfL2-2 in hL1 retrotransposons

(A) HeLa cells were co-transfected with 1 µg of indicator retrotransposon plasmid and 1 µg of effector plasmids encoding APOBEC proteins. Retrotransposition assay was performed and results processed as described in Figure 16. Data are the means ± SD for at least three independent experiments. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, t-test. (B) Successful expression of myc epitope-tagged lizard proteins in mammalian cells was confirmed in the HEK293T model. GAPDH was used as a loading control.

4.3.4 Učinek humanega in kuščarjevega proteina A1 na retrotranspozon ZfL2-1, ki zapisuje za ORF1p

Glavna razlika med retrotranspozonomoma hL1 in ZfL2-2 je v prisotnosti zapisa za protein ORF1p pri elementu hL1. Iz tega smo sklepali, da proteini A1 za inhibicijo retrotranspozicije elementov LINE potrebujejo protein ORF1p. Da bi sklep preverili, smo nabor proteinov APOBEC iz točke 4.3.3 testirali v testu retrotranspozicije z retrotranspozonom ZfL2-1 (Sugano in sod., 2006). Retrotranspozon ZfL2-1 iz ribe cebrice kodira protein ORF1p z esterazno domeno, ki je ohranjena pri elementih CR1 in L2 (Sugano in sod., 2006). V tem se razlikuje od elementov L1, katerih proteini ORF1p imajo namesto esterazne domene RNA-prepoznavni motiv (Khazina in Weichenrieder, 2009). Kljub temu pa naj bi protein ORF1p elementa ZfL2-1 opravljal iste funkcije in imel enake lastnosti kot protein ORF1p elementa hL1 (Nakamura in sod., 2012). Kot že pri testu retrotranspozicije z elementom hL1, ki zapisuje za ORF1p (slika 17), smo tudi z elementom ZfL2-1 zaznali 30-odstotni padec učinkovitosti retrotranspozicije v prisotnosti humanega in kuščarjevih proteinov A1 (slika 18), kar nakazuje, da je prisotnost proteina ORF1p kritičnega pomena za inhibicijo retrotranspozicije s proteini A1.



Slika 18: Učinek kuščarjevih in humanega proteina A1 na retrotranspozicijo retrotranspozona ZfL2-1 (vsebuje ORF1p) v celicah HeLa

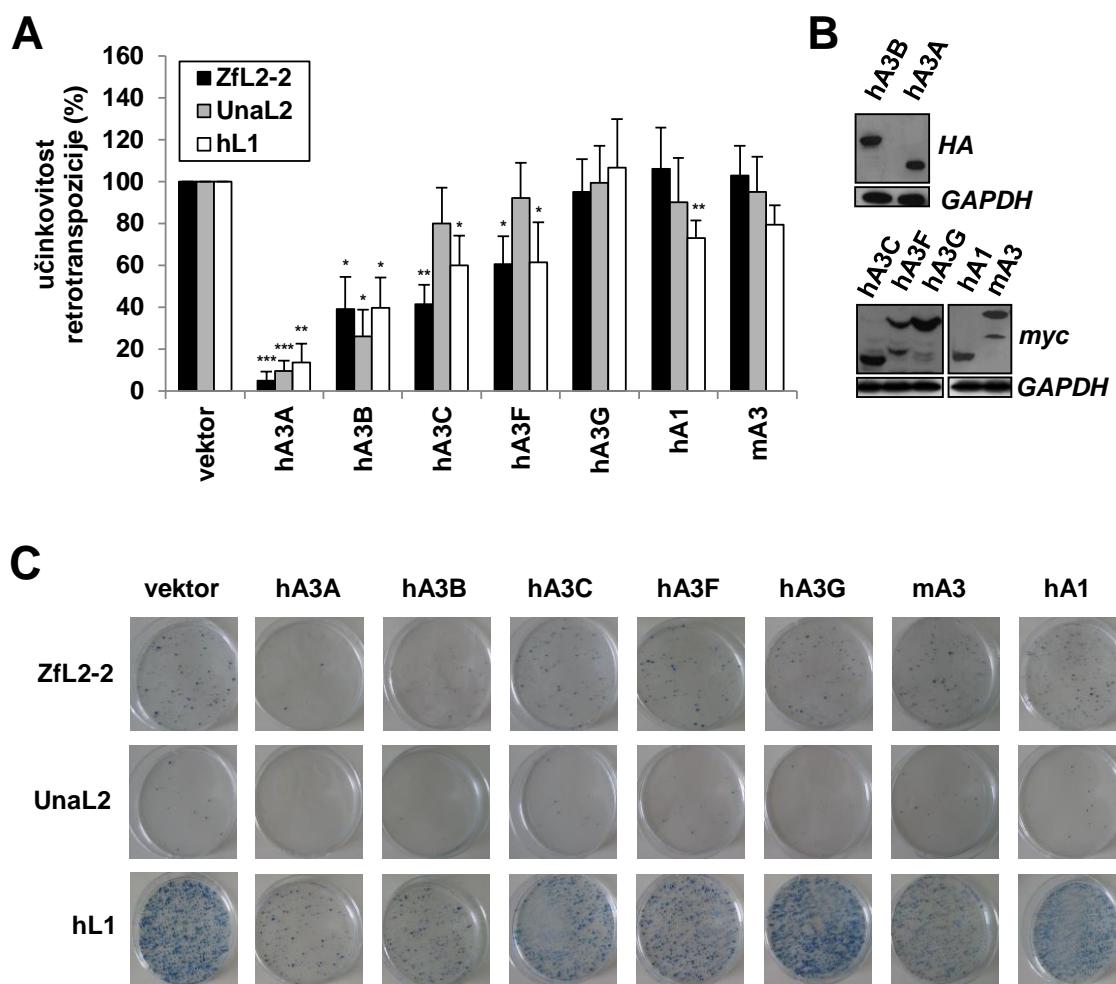
Celice HeLa smo transficirali z 2,5 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon in 2,5 µg plazmida z zapisom za proteine APOBEC. Test retrotranspozicije smo izvedli in rezultate obdelali kot je opisano pri sliki 16. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD za vsaj 3 neodvisne eksperimente. ***P<0,001, **P<0,01, t-test.

Figure 18. The effect of lizard and human A1 proteins on the retrotransposition of ORF1p-encoding ZfL2-1 retrotransposon in HeLa cells

HeLa cells were co-transfected with 2.5 µg of indicator retrotransposon plasmid and 2.5 µg of effector plasmids encoding APOBEC proteins. Retrotransposition assay was performed and results processed as described in Figure 16. Data are the means ± SD for three independent experiments. ***P<0.001, **P<0.01, t-test.

4.3.5 Učinek humanih proteinov A3 na retrotranspozicijo elementa ZfL2-2

Čeprav je bila inhibitorna aktivnost proteinov A3 že dokazana za številne retroelemente različnega izvora (Dutko in sod., 2005; Esnault in sod., 2005; Schumacher in sod., 2005; Bogerd in sod., 2006b), njihovo delovanje na retrotranspozone L2 še ni znano. Glede na učinek humanega proteina A3A (hA3A), ki smo ga opazili pri testu retrotranspozicije z elementi ZfL2-2 in ZfL2-1 (slike 16-18), smo predvidevali, da so tudi preostali proteini A3 potencialni inhibitorji elementov L2 in da razlike med elementi L1 in L2 ne vplivajo na njihovo inhibitorno delovanje. Da bi preverili našo hipotezo, smo testirali učinek vseh humanih proteinov A3 (hA3) na dva ribja elementa L2, in sicer element Zf2-2 iz ribe cebrice in L2 iz jegulje (UnaL2) (Kajikawa in Okada, 2002), oba pa primerjali z učinkom na element hL1 (Moran in sod., 1996). Največji inhibitorni učinek na retrotranspozicijo elementov L2 sta imela proteina hA3A in hA3B (slika 19). Protein hA3A je namreč znižal učinkovitost retrotranspozicije elementa ZfL2-2 na 5, elementa UnaL2 pa na 10 odstotkov, protein hA3B pa na 35 oz. 25 odstotkov. Tudi proteina hA3C in hA3F sta inhibirala retrotranspozone L2, vendar sta imela v primerjavi s proteinoma hA3A in hA3B manjši učinek.



Slika 19: Učinek proteinov A3 na retrotranspozicijo ribjih retrotranspozonov ZfL2-2 in UnaL2

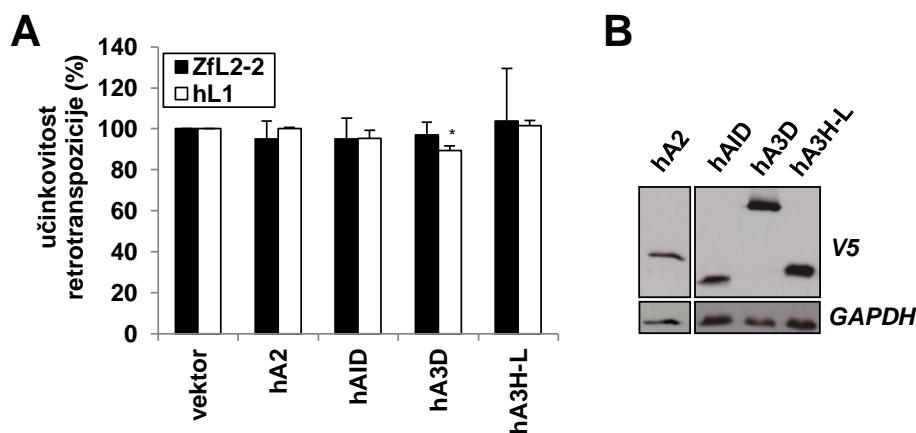
(A) Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za protein APOBEC in z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon ZfL2-2, UnaL2 ali hL1. Test retrotranspozicije smo izvedli in rezultate obdelali kot je opisano pri sliki 16. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD za vsaj 3 neodvisne eksperimente. ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05, t-test. (B) Izražanje s proteinsko oznako HA, myc ali V5 označenih proteinov iz (A) smo potrdili v celicah HEK293T, za kontrolo nanosa pa smo uporabili protitelesa proti proteinu GAPDH. (C) ponazarja fiksirane in pobarvane proti neomicinu odporne kolonije, ki predstavljajo rezultate iz (A).

Figure 19: The effect of A3 proteins on ZfL2-2 and UnaL2 retrotransposition

(A) HeLa cells were co-transfected with 1 µg of APOBEC protein encoding plasmid and 1 µg of ZfL2-2, UnaL2 and hL1 retrotransposon plasmid. Retrotransposition assay was performed and results processed as described in Figure 16. Data are the means ± SD for at least three independent experiments. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, t-test. (B) Successful expression of HA, myc or V5 epitope-tagged proteins from (A) was confirmed in the HEK293T model. GAPDH was used as a loading control. (C) shows fixed and stained neomycin resistant colonies representing results compiled in (A).

Nasprotno pa mišji protein A3 (mA3) in humani proteini hA1, hA3G (slika 19), ter hA3D, hA3H, hA3H-L, hAID in hA2 (slika 20) niso inhibirali retrotranspozonov L2. Za protein A3H smo test izvedli z divjim tipom proteina (haplotip I) in njegovim mutantom hA3H-L, ki se zaradi odsotnosti prezgodnjega stop kodona izrazi v protein polne dolžine (210 ak)

(Dang in sod., 2008). V celicah HEK293T smo lahko zaznali samo izražanje mutanta hA3H-L, divjega tipa proteina hA3H pa ne (slika 20), tako kot poročajo Dang in sod. (2008). Inhibitorno aktivnost proteina hA3H proti retrotranspozonu hL1 so zaznali le za protein hA3H-Var haplotipa II (Muckenfuss in sod., 2006; Kinomoto in sod., 2007; Tan in sod., 2009), ki pa nam na žalost ni bil dostopen. Tudi rezultati raziskav inhibicije elementa hL1 s proteinom hA3D si nasprotujejo, saj nekatere skupine poročajo o močni inhibiciji (Niewiadomska in sod., 2007), nekatere o delni (Kinomoto in sod., 2007), spet druge pa učinka proteina hA3D na retrotranspozicijo elementa hL1 niso zaznale (Stenglein in Harris, 2006). Mi smo opazili zanemarljivo majhen učinek proteina hA3D na element hL1, učinka na element L2 pa ne.



Slika 20: Učinek humanih proteinov hA2, hAID, hA3D in hA3H-L na retrotranspozicijo elementa ZfL2-2

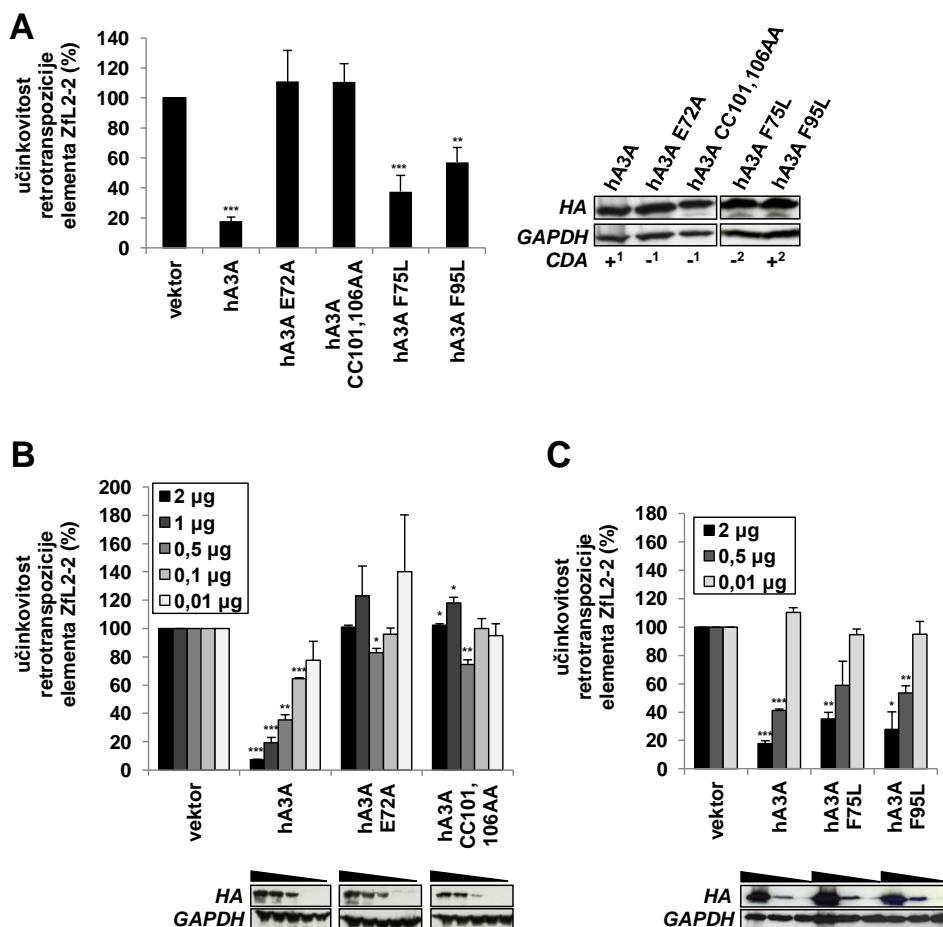
(A) Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za humani protein AID/APOBEC in z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon ZfL2-2 ali hL1. Test retrotranspozicije smo izvedli in rezultate obdelali kot je opisano pri sliki 16. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD za vsaj 3 neodvisne eksperimente. *P<0,05, t-test. (B) Izražanje s proteinsko označo V5 označenih proteinov iz (A) smo potrdili v celicah HEK293T, za kontrolo nanosa pa smo uporabili protitelesa proti proteinu GAPDH.

Figure 20: The effect of human hA2, hAID, hA3D and hA3H-L proteins on ZfL2-2 retrotransposition
 (A) HeLa cells were co-transfected with 1 µg of retrotransposon plasmid and 1 µg of plasmid encoding human AID/APOBEC protein. Retrotransposition assay was performed and results processed as described in Figure 16. Data are the means ± SD for at least three independent experiments. *P<0,05, t-test. (B) Successful expression of V5 epitope-tagged proteins from (A) was confirmed in the HEK293T model. GAPDH was used as a loading control.

Dokazali smo torej, da proteini hA3 inhibirajo elemente L2 (slike 16–19) v podobnem obsegu kot element hL1 (Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006; Stenglein in Harris, 2006; Niewiadomska in sod., 2007) in da so najmočnejši inhibitorji retrotranspozona ZfL2-2 v celicah HeLa humani proteini A3A, A3B, A3C in A3F. Proteini A3 torej za razliko od proteinov A1 inhibirajo tako element hL1 kot tudi element ZfL2-2, in sicer s podobno učinkovitostjo.

4.3.6 Pomen ohranjenega aktivnega mesta proteina hA3A za inhibicijo retrotranspozona ZfL2-2

Ker so humani proteini A3 inhibirali tako retrotranspozone L1 kot tudi L2, smo predvidevali, da so za inhibicijo retrotranspozicije obeh elementov LINE potrebne podobne strukturne lastnosti proteinov A3. Iz literature je znano, da protein hA3A za inhibicijo elementa hL1 potrebuje integriteto aktivnega mesta (Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006). Ali enako velja tudi za inhibicijo retrotranspozona ZfL2-2, smo preverili s testiranjem dveh mutant v aktivnem mestu proteina hA3A, in sicer mutant hA3A E72A in hA3A CC101, 106AA, ki sta encimsko neaktivni (Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006). Mutacije v aktivnem mestu so povzročile popolno izgubo inhibitorne aktivnosti proteina hA3A proti elementu ZfL2-2 (slika 21), kar smo dodatno potrdili z od doze odvisnim testom retrotranspozicije (slika 21B). Ali je za zaviranje retrotranspozicije elementa ZfL2-2 potrebna encimska aktivnost proteina hA3A, smo preučili s testiranjem dveh mutant v ohranjenem citidin deaminaznem zaporedju, in sicer encimsko aktivne mutante F95L in encimsko neaktivne mutante F75L, ki obe inhibirata replikacijo z adenovirusom povezanega virusa (Narvaiza in sod., 2009). Opazili smo, da sta obe mutanti učinkovitost retrotranspozicije elementa ZfL2-1 zmanjšali kar za 60 odstotkov (slika 21, A in C). Naši rezultati torej nakazujejo, da je ohraneno aktivno mesto proteina A3A nujno za uspešno inhibicijo retrotranspozona ZfL2-2, encimska aktivnost pa za to ni potrebna.



Slika 21: Učinek mutacij v skupnem zaporedju enodomenskega proteina hA3A na njegovo sposobnost inhibicije retrotranspozona ZfL2-2

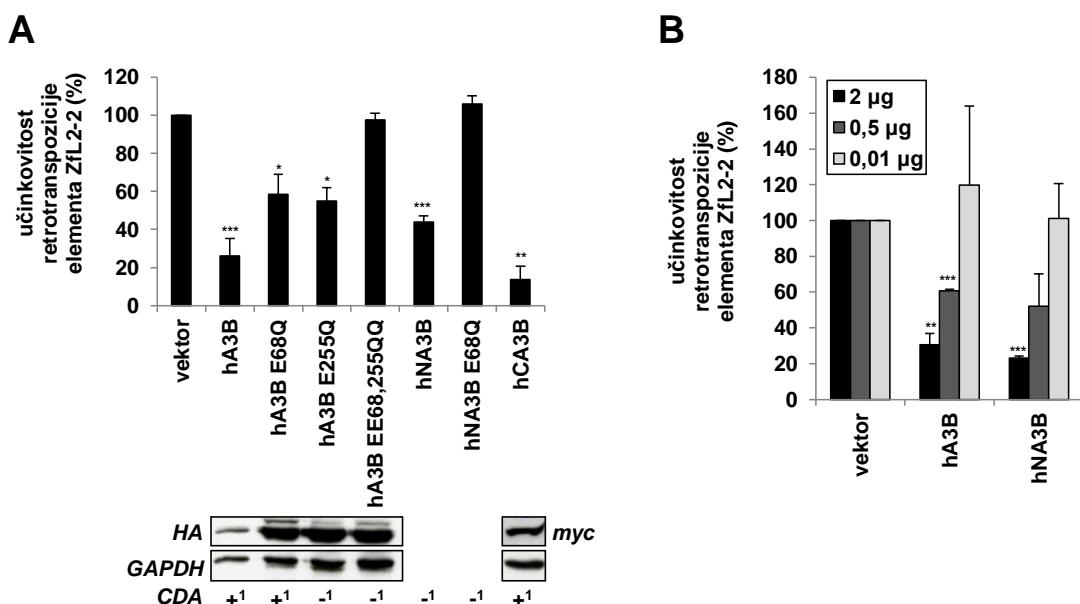
(A) Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon ZfL2-2 in z 1 µg plazmida z zapisom za protein hA3A ali njegove mutantne. Prehodno izražanje s proteinsko oznako HA označenega proteina hA3A in njegovih mutantov smo potrdili v celicah HEK293T, za kontrolo nanosa pa smo uporabili protitelesa proti proteinu GAPDH. (B, C) Od doze proteina hA3A odvisen test retrotranspozicije, izveden z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon ZfL2-2 in različnimi količinami plazmida z zapisom za protein hA3A in njegovih encimsko neaktivnih mutantov (B), ali njegovih mutantov v skupnem zaporedju (C). Test retrotranspozicije smo izvedli in rezultate obdelali kot je opisano pri sliki 16. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD za vsaj 3 neodvisne eksperimente. ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05, t-test. Prikazana je tudi encimska aktivnost posameznega proteina, in sicer: +, CDA; -, nima CDA; 1 (Chen in sod., 2006); 2 (Narvaiza in sod., 2009).

Figure 21: Consensus site mutations effect on single domain hA3A protein inhibitory activity against ZfL2-2 retrotransposition

(A) HeLa cells were co-transfected with 1 µg of retrotransposon ZfL2-2 plasmid and 1 µg of plasmid encoding the hA3A effector or its mutants. Transient expression of HA epitope-tagged A3A protein and its mutants was confirmed in the HEK293T model. GAPDH was used as a loading control. (B, C) Dose-dependent inhibition experiments using 1 µg of retrotransposon ZfL2-2 encoding plasmid and different amounts of hA3A encoding plasmid and its catalytic mutants (B) or its consensus site mutants (C). Retrotransposition assay was performed and results processed as described in Figure 16. Data are the means ± SD for at least three independent experiments. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, t-test. Enzymatic activity of each protein is designated. +, CDA; -, no CDA; 1 (Chen in sod., 2006); 2 (Narvaiza in sod., 2009).

4.3.7 Pomen encimske aktivnosti humanega proteina hA3B za inhibicijo retrotranspozona ZfL2-2

Da bi ugotovili, ali je encimska aktivnost humanega proteina A3B (hA3B) potrebna za inhibicijo retrotranspozona ZfL2-2, kot je bilo opaženo pri inhibiciji elementa hL1 (Bogerd in sod., 2006b; Stenglein in Harris, 2006), smo testirali različne mutante proteina hA3B v testu retrotranspozicije. Protein hA3B ima dve domeni CDA. Prva, N-končna domena (hNA3B) naj bi opravljala funkcijo vezave nukleinskih kislin, druga, C-končna domena (hCA3B) pa naj bi bila odgovorna za encimsko aktivnost (Bogerd in sod., 2006b; Bogerd in sod., 2007). V naši raziskavi smo opazili, da obe delecijski mutanti zavirata retrotranspozicijo elementa ZfL2-2 tako učinkovito kot divji tip proteina hA3B (slika 22). Ker izražanja mutantne hNA3B nismo uspeli zaznati v sesalskih celicah, smo njen učinek potrdili z izvedbo od doze odvisnega testa retrotranspozicije (slika 22B). Encimska mutanta hNA3B v ohranjenem zaporedju (hNA3B E68Q) je popolnoma izgubila svoj zaviralni učinek proti retrotranspozonu ZfL2-2 (slika 22A). Nasprotno sta mutanti hA3B E68Q in hA3B E255Q (Bogerd in sod., 2006b) vsaj deloma ohranili svojo inhibitorno aktivnost proti elementu ZfL2-2, medtem ko je dvojna encimsko neaktivna mutanta A3B EE68, 255QQ popolnoma izgubila svojo aktivnost. Iz rezultatov lahko zaključimo, da je za inhibicijo retrotranspozicije elementa ZfL2-2 s proteinom hA3B potrebna encimska aktivnost vsaj ene domene, skratka, da je inhibitorno delovanje proteina hA3B proti elementu ZfL2-2 odvisno od encimske aktivnosti.



Slika 22: Učinek mutacij v skupnih zaporedjih dvodomenskega proteina hA3B na njegovo sposobnost inhibicije retrotranspozona ZfL2-2

(A) zgoraj: Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon ZfL2-2 in 1 µg plazmida z zapisom za protein hA3B ali njegove mutante. (A) spodaj: Prehodno izražanje s proteinsko označko HA ali myc označenih proteinov smo potrdili v celicah HEK293T, za kontrolo nanosa pa smo uporabili protitelesa proti proteinu GAPDH. Prikazana je tudi encimska aktivnost posameznega proteina, in sicer: +, CDA; -, nima CDA; 1 (Bogerd in sod., 2006b). (B) Od doze proteina hA3B odvisen test retrotranspozicije izveden z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon ZfL2-2 in različnimi količinami plazmida z zapisom za protein hA3B in njegovega mutanta hNA3B. Test retrotranspozicije smo izvedli in rezultate obdelali kot je opisano pri sliki 16. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD za vsaj 3 neodvisne eksperimente. ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05, *t*-test.

Figure 22: The effect of consensus region mutations on the inhibitory activity of double domain hA3B protein on ZfL2-2 retrotransposition

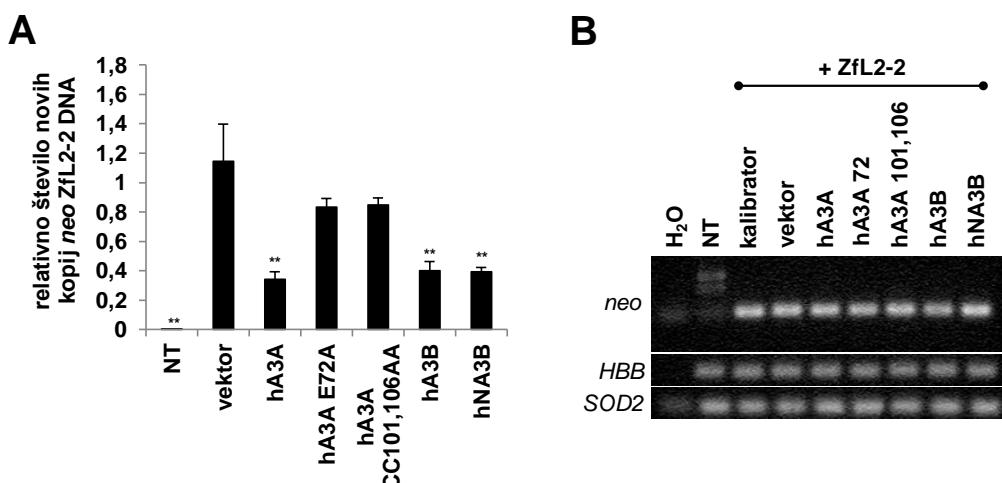
(A) HeLa cells were co-transfected with 1 µg of retrotransposon ZfL2-2 plasmid and 1 µg of effector plasmid coding the hA3B effector or its mutants. Transient expression of HA or myc epitope-tagged proteins was confirmed in the HEK293T model. GAPDH was used as a loading control. Enzymatic activity of each protein is designated. +, CDA; -, no CDA; 1 (Bogerd in sod., 2006b). (B) Dose-dependent inhibition experiments using 1 µg of retrotransposon ZfL2-2 encoding plasmid, and different amounts of plasmids encoding hA3B and its hNA3B mutant. Retrotransposition assay was performed and results processed as described in Figure 16. Data are the means ± SD for at least three independent experiments. ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05, *t*-test.

4.4 VPLIV PROTEINOV AID/APOBEC NA RELATIVNO ŠTEVILO NOVIH KOPIJ RETROTRANSPOZONSKE DNA IN RNA

4.4.1 Vpliv proteinov hA3 na relativno število novih kopij DNA retrotranspozona ZfL2-2

Humana proteina A3A in A3B inhibirata retrotranspozicijo elementa hL1 preko zniževanja števila novih kopij DNA retrotranspozona hL1 (Stenglein in Harris, 2006; Kinomoto in

sod., 2007; Niewiadomska in sod., 2007; Bulliard in sod., 2011). Da bi ugotovili, ali uporabljata podoben mehanizem tudi za inhibicijo elementa ZfL2-2, smo učinek obeh proteinov in njunih mutantov na količino novih kopij DNA elementa ZfL2-2 določili z metodo qPCR (slika 9). Celice, uspešno transficirane z retrotranspozonskim plazmidom, smo namnožili ob selekciji s higromicinom. Iz njih smo izolirali celotno celično DNA, nato pa pomnoževali nove kopije retrotranspozonske DNA po reverzni transkripciji in izrezovanju introna. To smo izvedli z uporabo začetnih oligonukleotidov, ki so se prilegali na ekson neomicinskega gena. Tako smo lahko pomnožili kopije retrotranspozona ZfL2-2, na novo integrirane v genom, prav tako pa tudi iz njih prepisane cDNA, ki se še niso vgradile v genom. Naši rezultati nakazujejo, da proteina hA3A in hA3B znižata relativno število novih kopij DNA elementa ZfL2-2 (slika 23).



Slika 23: Učinek proteinov A3 na relativno število novih kopij DNA retrotranspozona ZfL2-2 v celicah HeLa

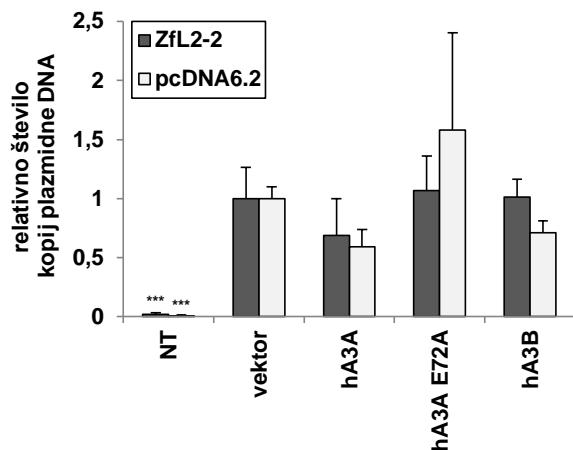
(A) Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon ZfL2-2 ali hL1 in z 1 µg plazmida z zapisom za protein A3. Po 4-dnevni selekciji s higromicinom smo izolirali celotno celično DNA in jo analizirali s qPCR. Specifično smo pomnoževali fragment *neo* brez introna, njegovo relativno število pa normalizirali na vrednost v istem vzorcu prisotnih referenčnih genov *HBB* in *SOD2*. Dobljene vrednosti za posamezne vzorce smo normalizirali na vrednosti negativnih kontrol, pridobljenih s celicami, transficiranimi s praznim vektorjem. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD dveh neodvisnih eksperimentov. (B) prikazuje analizo pomnoženih fragmentov z AGE. **P<0,01, t-test. NT, netransficirane celice; kalibrator, DNA izolirana iz celic transficiranih s plazmidom z zapisom za retrotranspozon in s praznim plazmidom, ki nam je služila za odpravljanje razlik med posameznimi reakcijami.

Figure 23: The effect of hA3 proteins on the relative number of novel ZfL2-2 DNA copies in HeLa cells
(A) HeLa cells were transfected with plasmids encoding ZfL2-2 or hL1 retrotransposon and A3 effector plasmids (1 µg of each). After 4 days of hygromycin selection, total cellular DNA was extracted and subjected to qPCR. An amplicon from the spliced *neo* cassette was specifically amplified, and its relative number normalized to the value of two reference genes, *SOD2* and *HBB*. Negative control values obtained with cells transfected with an empty vector were set as 1. Histogram bars represent the means ± SD from two independent experiments. (B) represents AGE analysis of the amplified fragments. **P<0,01, t-test. NT, untransfected cells. Kalibrator, DNA isolated from cells transfected with plasmid encoding retrotransposon and an empty plasmid used to prevent variability between runs.

Encimsko neaktivna mutanta proteina hA3A, ki nista inhibirala retrotranspozicije elementa ZfL2-2 (slika 21), nista vplivala niti na relativno število novih kopij DNA elementa ZfL2-2 (slika 23). Nasprotno je encimsko neaktivni mutant hNA3B, ki je močno inhibiral retrotranspozicijo elementa ZfL2-2 (slika 22), znižal relativno število novih kopij DNA retrotranspozona ZfL2-2 v enaki meri kot divji tip proteina hA3B (slika 23). Naša analiza qPCR se torej ujema z rezultati testa retrotranspozicije (slike 19–22) in nakazuje, da humana proteina hA3A in hA3B inhibirata retrotranspozicijo elementa ZfL2-2 z zniževanjem relativnega števila novih kopij DNA retrotranspozona ZfL2-2.

4.4.1.1 Vpliv proteinov hA3 na relativno število kopij plazmidne DNA

Humani proteini A3 naj bi v celici razgrajevali tujo DNA (Stenglein in sod., 2010). Da bi preučili, ali je opažen učinek proteinov A3 na retrotranspozicijo posledica razgradnje transficirane plazmidne DNA, smo izvedli analizo s qPCR (slika 24). V vzorcih celične DNA smo vpliv proteinov A3 na relativno število kopij plazmida ZfL2-2 ali plazmida pcDNA6.2 določali, kot je opisano pod točko 3.2.3.4. Iz rezultatov zaključujemo, da pri naših eksperimentalnih pogojih proteina hA3A in hA3B nimata signifikantnega učinka na relativno število kopij plazmidne DNA. V skladu s tem so Bulliard in sod. (2011) opazili, da je učinek proteina hA3A na raven plazmidne DNA v primerjavi z učinkom na inhibicijo elementa hL1 signifikantno šibkejši (Bulliard in sod., 2011).



Slika 24: Vpliv proteinov hA3 na relativno število kopij plazmidne DNA

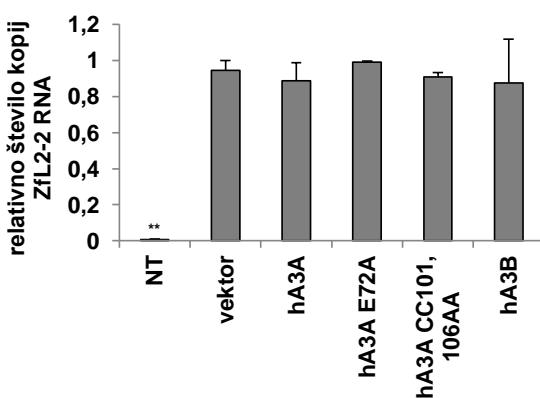
Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon ZfL2-2, ali praznim vektorjem pcDNA6.2, in z 1 µg plazmida z zapisom za protein hA3. Dva dni po transfekciji smo izolirali celotno celično DNA in učinek proteinov hA3 na relativno število kopij plazmidne DNA ocenili s qPCR. Specifično smo pomnoževali del fragmenta *neo* z intronom, ki je prisoten na plazmidu ZfL2-2, ali fragment, ki je del zapisa za odpornost proti blasticidinu na plazmidu pcDNA6.2. Relativno število kopij plazmida smo normalizirali na vrednost v istem vzorcu prisotnih referenčnih genov HBB in SOD2. Dobljene vrednosti za posamezne vzorce smo normalizirali na vrednosti negativnih kontrol, pridobljenih s celicami, transficiranimi s praznim vektorjem. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD dveh neodvisnih eksperimentov. ***P < 0,001, t-test. NT, netransficirane celice.

Figure 24: The effect of hA3 proteins on the relative number of plasmid DNA

HeLa cells were co-transfected with 1 µg of the target plasmids encoding ZfL2-2 retrotransposon, or an empty vector pcDNA6.2, and 1 µg of the hA3-encoding plasmid. Two days after transfection, total cellular DNA was extracted and the effect of hA3 proteins on plasmid DNA was estimated by qPCR. *Neo*-intron spanning fragment present in ZfL2-2 plasmid, or a part of the blasticidin encoding gene present in the pcDNA6.2 vector, were specifically amplified. Their relative numbers were normalized to the values of two reference genes, *SOD2* and *HBB*. Negative control values obtained with cells transfected with an empty vector were set as 1. Histogram bars represent the means ± SD from two independent experiments. ***P < 0.001, *t*-test. NT, untransfected cells.

4.4.1.2 Vpliv proteinov hA3 na relativno število kopij retrotranspozonske RNA

Nadalje smo preučili, ali proteini A3 vplivajo na izražanje retrotranspozonske RNA, ki se sintetizira s plazmida, vstavljenega v celice. V ta namen smo 2 dni po transfekciji izolirali RNA iz celic, transficiranih s plazmidoma z retrotranspozonom ZfL2-2 in proteinom hA3 ali njihovimi mutanti, kot je opisano pod točko 3.2.3.6. Izolirano RNA smo obratno prepisali v cDNA in s qPCR določili relativno število fragmentov *neo* z intronom, ki se izražajo s plazmida ZfL2-2 (slika 25).



Slika 25: Vpliv proteinov hA3 na relativno število kopij retrotranspozonske RNA

Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon ZfL2-2 in z 1 µg plazmida z zapisom za proteina hA3A in hA3B ter njune mutante. 2 dni po transfekciji smo iz celic izolirali RNA in učinek proteinov hA3 na retrotranspozonsko RNA ocenili s qPCR in specifičnim pomnoževanjem fragmenta *neo* z intronom, ki se izraža s plazmida. Relativno število kopij ZfL2-2 cDNA smo normalizirali na vrednost v istem vzorcu prisotne referenčne cDNA gena GAPDH. Dobljene vrednosti za posamezne vzorce smo normalizirali na vrednosti negativnih kontrol, pridobljenih s celicami, transficiranimi s praznim vektorjem. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD dveh neodvisnih eksperimentov. **P < 0,01, *t*-test. NT, netransficirane celice.

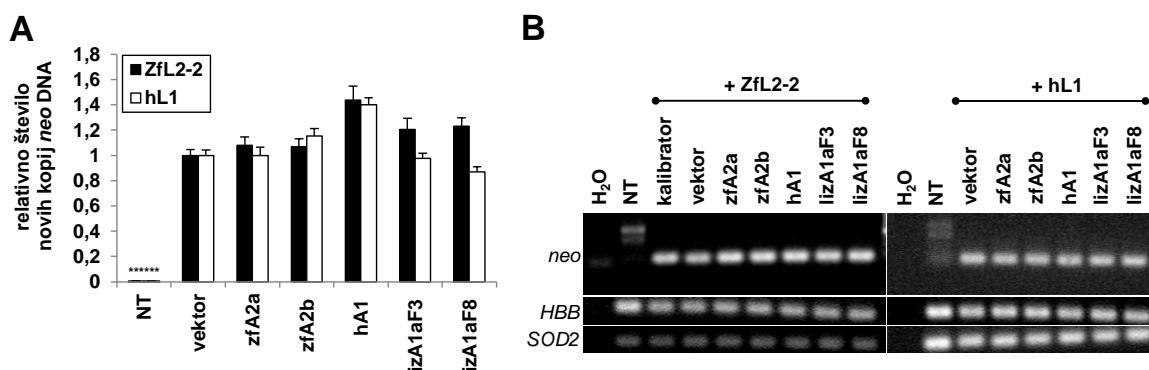
Figure 25: The effect of hA3 proteins on the relative number of ZfL2-2 RNA copies

HeLa cells were co-transfected with 1 µg of the target plasmids encoding ZfL2-2, and with 1 µg of plasmid encoding hA3A and hA3B proteins and their mutants. 2 days after transfection, RNA was isolated, cDNA was synthesised, and the effect of hA3 proteins on retrotransposon expression from the transfected plasmid was measured by specific amplification of the *neo*-intron spanning fragment with qPCR. The relative numbers of ZfL2-2 cDNA were normalized to those obtained after amplification of GAPDH cDNA. Values obtained with RNA from cells transfected with an empty vector were set as 1. Histogram bars represent the means ± SD of two independent experiments. **P < 0.01, *t*-test. NT, untransfected cells.

Kot je že bilo opaženo v primeru elementa hL1 (Bulliard in sod., 2011), proteina hA3A in hA3B ali njune mutante niso imele opaznega vpliva na relativno število ZfL2-2 RNA, zaradi česar lahko izključimo možnost, da bi bila opažena inhibicija retrotranspozicije posledica vpliva proteinov A3 na izražanje retrotranspozonske RNA s plazmidov.

4.4.2 Vpliv kuščarjevih in ribjih proteinov APOBEC na relativno število novih kopij DNA retrotranspozonov ZfL2-2 in hL1

Da bi določili učinek kuščarjevih in humanega proteina A1 na relativno število novih kopij DNA retrotranspozonov LINE, smo izvedli qPCR na podoben način, kot je že opisano zgoraj za proteine hA3 (4.4.1). Nobena izmed naravnih variant kuščarjevega proteina A1a (F3 in F8) ni imela signifikantnega učinka na relativno število novih kopij DNA hL1 in ZfL2-2 (slika 26).



Slika 26: Učinek ribjih in kuščarjevih proteinov APOBEC na relativno število novih kopij DNA retrotranspozona ZfL2-2 ali hL1 v celicah HeLa

(A) Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspon ZfL2-2 ali hL1 in z 1 µg plazmida z zapisom za protein APOBEC. Po 4-dnevni selekciji s higromicinom smo izolirali celotno celično DNA in jo analizirali s qPCR. Reakcijo smo izvedli in rezultate obdelali kot je opisano pri sliki 23. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD dveh neodvisnih eksperimentov. ***P < 0,001, t-test. NT, netransficirane celice. (B) prikazuje analizo pomnoženih fragmentov z AGE. NT, netransficirane celice; kalibrator, DNA izolirana iz celic transficiranih z plazmidom z zapisom za retrotranspon in s praznim plazmidom, ki nam je služila za odpravljanje razlik med posameznimi reakcijami.

Figure 26: The effect of zebrafish and lizard APOBEC proteins on the relative copy number of novel ZfL2-2 and hL1 DNA in HeLa cells

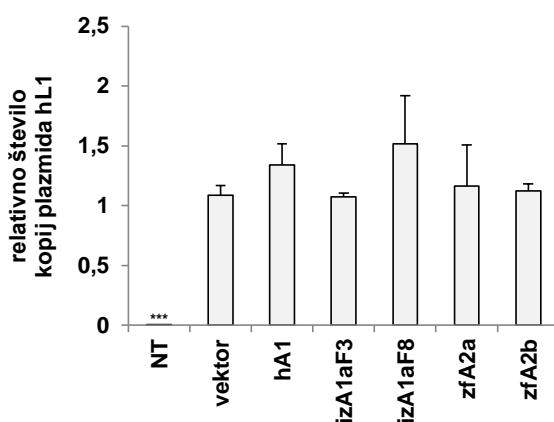
(A) HeLa cells were transfected with plasmids encoding ZfL2-2 or hL1 retrotransposon and APOBEC effector plasmids (1 µg of each). After 4 days of hygromycin selection, total cellular DNA was extracted and subjected to qPCR. Reaction was performed and results processed as described in Figure 23. Histogram bars represent the means ± SD from two independent experiments. (B) represents AGE analysis of the amplified fragments. ***P < 0.001, t-test. NT, untransfected cells. Kalibrator, DNA isolated from cells transfected with plasmid encoding retrotransposon and an empty plasmid used to prevent variability between runs.

Opazili smo tudi, da v skladu z rezultati testa retrotranspozicije (slika 16) proteina A2a in A2b iz ribe cebrice nimata učinka na relativno število novih kopij DNA hL1 in ZfL2-2.

Naši rezultati nakazujejo, da proteini A1 ne inhibirajo retrotranspozicije elementa hL1 preko zmanjšanja relativnega števila novih kopij DNA retrotranspozona hL1.

4.4.2.1 Vpliv proteinov A1 na relativno število kopij plazmidne DNA

Da bi preučili, ali je opaženi učinek proteinov A1 na retrotranspozicijo elementa hL1 posledica razgradnje plazmidne DNA, ki smo jo s transfekcijo vstavili v celice, smo izvedli analizo s qPCR (slika 27) kot je opisano pod točko 3.2.3.4. Naši rezultati nakazujejo, da testirani proteini A1 ne razgrajujejo plazmidne DNA.



Slika 27: Vpliv proteinov A1 na relativno število kopij plazmidne DNA

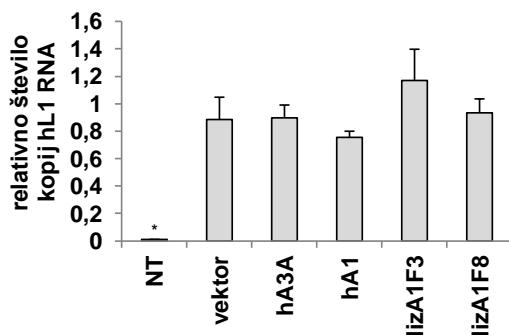
Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon hL1 in z 1 µg plazmida z zapisom za protein APOBEC. Dva dni po transfekciji smo izolirali celotno celično DNA in učinek proteinov APOBEC na količino plazmidne DNA ocenili s qPCR. Specifično smo pomnoževali del fragmenta *neo* z intronom, ki je prisoten na plazmidu hL1. Relativno število kopij plazmida smo normalizirali na vrednost v istem vzorcu prisotnih referenčnih genov *HBB* in *SOD2*. Dobljene vrednosti za posamezne vzorce smo normalizirali na vrednosti negativnih kontrol, pridobljenih s celicami, transficiranimi s praznim vektorjem. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD dveh neodvisnih eksperimentov. ***P < 0,001, t-test. NT, netransficirane celice.

Figure 27: The effect of A1 proteins on the relative copy number of plasmid DNA

HeLa cells were co-transfected with 1 µg of the target plasmids encoding hL1 retrotransposon and 1 µg of the APOBEC-encoding plasmid. Two days after transfection, total cellular DNA was extracted and the effect of APOBEC proteins on plasmid DNA was estimated by qPCR. *Neo*-intron spanning fragment present in hL1 plasmid was specifically amplified. Its levels was normalized to the level of two reference genes, *SOD2* and *HBB*. Negative control values obtained with cells transfected with an empty vector were set as 1. Histogram bars represent the means ± SD from two independent experiments. ***P < 0.001, t-test. NT, untransfected cells.

4.4.2.2 Vpliv proteinov A1 na relativno število kopij retrotranspozonske RNA

Vpliv proteinov A1 na relativno število kopij hL1 RNA smo v vzorcih RNA iz celic, transficiranih s plazmidom z retrotranspozonom hL1 in humanim ali kuščarjevim proteinom A1, izključili s qPCR (slika 28), kot je opisano zgoraj (točka 4.4.1.2) za proteine A3.



Slika 28: Vpliv proteinov A1 na relativno število kopij hL1 RNA

Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon hL1 in z 1 µg plazmida z zapisom za protein A1. Dva dni po transfekciji smo iz celic izolirali RNA, sintetizirali cDNA in učinek proteinov A1 na hL1 RNA ocenili s qPCR in specifičnim pomnoževanjem fragmenta *neo* z intronom, ki se izraža iz plazmida. Relativno število kopij hL1 cDNA smo normalizirali na vrednost v istem vzorcu prisotne referenčne cDNA gena GAPDH. Dobljene vrednosti za posamezne vzorce smo normalizirali na vrednosti negativnih kontrol, pridobljenih s celicami, transficiranimi s praznim vektorjem. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD dveh neodvisnih eksperimentov. *P < 0.05, t-test. NT, netransficirane celice.

Figure 28: The effect of A1 proteins on the relative number of hL1 RNA copies

HeLa cells were co-transfected with 1 µg of the target plasmids encoding hL1 and with 1 µg of plasmid encoding A1 proteins. Two days after transfection RNA was isolated, cDNA was synthesised, and the effect of A1 proteins on hL1 expression from the plasmid was measured by specific amplification of the *neo*-intron spanning fragment with qPCR. The relative numbers of hL1 cDNA were normalized to those obtained after amplification of GAPDH cDNA. Values obtained with RNA from cells transfected with an empty vector were set as 1. Histogram bars represent the means ± SD of two independent experiments. *P < 0.05, t-test. NT, untransfected cells.

4.5 VPLIV PROTEINOV AID/APOBEC NA NUKLEOTIDNA ZAPOREDJA NOVIH KOPIJ DNA RETROTRANSPOZONOV ZfL2-2 IN hL1

Predhodne raziskave na novih kopijah DNA retrotranspozona hL1, ki nastajajo v prisotnosti proteinov hA3A, hA3B in hA1, niso razkrile hipermutacij (Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006; Ikeda in sod., 2011). Ali tudi v naši raziskavi testirani proteini AID/APOBEC iz ribe cebrice, kuščarja, miši ali človeka zavirajo retrotranspozicijo elementov ZfL2-2 in hL1 brez hipermutiranja, smo ugotavljalci z določanjem nukleotidnega zaporedja novih kopij DNA (slika 29).

A

hA3A		V				hA3B		V				hA3C		V				
Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	
		A	---	0	0			A	---	0	2			A	---	0	0	1
Iz		C	0	---	0			C	0	---	1			C	0	---	0	0
		G	2	1	---			G	0	2	---			G	0	---	0	0
		T	1	1	2			T	0		1			T	0	0	2	---
						N=2064						N=2740						
hA3F		V				hA3G		V				mA3		V				
Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	
		A	---	0	0			A	---	1	1			A	---	0	0	0
Iz		C	0	---	0			C	0	---	0			C	0	---	0	1
		G	0	0	---			G	0	0	---			G	1	0	---	0
		T	0	0	0			T	0	1	2			T	1	1	1	---
						N=2984						N=3350						
zfA2b		V				zfA2a		V				zfAID		V				
Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	
		A	---	0	0			A	---	0	19			A	---	0	0	0
Iz		C	0	---	0			C	11	---	15			C	0	---	0	0
		G	5	0	---			G	7	8	---			G	5	0	---	5
		T	0	0	0			T	2	12	8			T	0	0	0	---
						N=2460						N=1936						
hA1		V				lizA1aF3		V				lizA1aF8		V				
Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	
		A	---	0	10			A	---	0	12			A	---	0	13	2
Iz		C	5	---	0			C	5	---	2			C	5	---	2	7
		G	5	0	---			G	3	4	---			G	3	4	---	6
		T	0	0	0			T	1	6	4			T	0	0	1	---
						N=2445						N=2579						
pcDNA6.2		V				lizA1aF3		V				lizA1aF8		V				
Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	
		A	---	0	0			A	---	0	1			A	---	0	0	0
Iz		C	0	---	0			C	0	---	0			C	0	---	0	0
		G	0	0	---			G	5	7	---			G	5	0	---	5
		T	0	0	0			T	4	13	5			T	0	0	0	---
						N=2445						N=1890						
pcDNA6.2		V				lizA1aF3		V				lizA1aF8		V				
Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	
		A	---	0	1			A	---	0	19			A	---	0	11	0
Iz		C	0	---	0			C	7	---	7			C	5	---	0	0
		G	0	0	---			G	5	7	---			G	5	0	---	5
		T	0	0	0			T	4	13	5			T	0	0	0	---
						N=2445						N=2445						

B

lizA1aF3		V				lizA1aF8		V				pcDNA6.2		V				
Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	
		A	---	0	1			A	---	0	12			A	---	0	13	2
Iz		C	0	---	0			C	5	---	2			C	5	---	2	7
		G	0	0	---			G	3	4	---			G	3	4	---	6
		T	0	0	0			T	1	6	4			T	0	0	1	---
						N=2445						N=1890						
pcDNA6.2		V				lizA1aF3		V				lizA1aF8		V				
Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	Iz		A	C	G	T	
		A	---	0	1			A	---	0	19			A	---	0	11	0
Iz		C	0	---	0			C	7	---	7			C	5	---	0	0
		G	0	0	---			G	5	7	---			G	5	0	---	5
		T	0	0	0			T	4	13	5			T	0	0	0	---
						N=2445						N=2445						

Slika 29: Učinek proteinov AID/APOBEC na nukleotidna zaporedja novih kopij DNA elementov ZfL2-2 in hL1

Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom AID/APOBEC protein in z 1 µg plazmida z zapisom za (A) retrotranspozon ZfL2-2, ali (B) za retrotranspozon hL1. Po 4-dnevni selekciji s higromicinom smo izolirali celotno celično DNA in z uporabo začetnih oligonukleotidov neo437s in neo1808as pomnožili fragmente *neo*. Daljše kopije fragmentov *neo* smo od tistih brez introna ločili z AGE. Fragmenti *neo* brez introna smo vstavili v vektor pCR2.1, in sekvencirali vsaj 5 neodvisnih klonov. Analizo mutacij smo izvedli s programskim paketom Hypermut (Rose in Korber, 2000). N, število sekvenciranih baz.

Figure 29: The effect of AID/APOBEC protein on sequences of the novel ZfL2-2 and hL1 DNA copies
HeLa cells were co-transfected with 1 µg of the effector plasmids encoding the respective AID/APOBEC protein and 1 µg of the target plasmids encoding (A) ZfL2-2, or (B) hL1 retrotransposon. After 4 days of hygromycin selection, the total cellular DNA was isolated. *Neo* fragments were amplified with primers neo437s and neo1808as. Intronless *neo* fragments were separated from unspliced *neo* fragments by AGE. The spliced *neo* fragments were inserted into the pCR2.1 cloning vector and at least 5 independent clones were sequenced. Mutation analysis was performed using the Hypermut software (Rose in Korber, 2000). N, total number of bases.

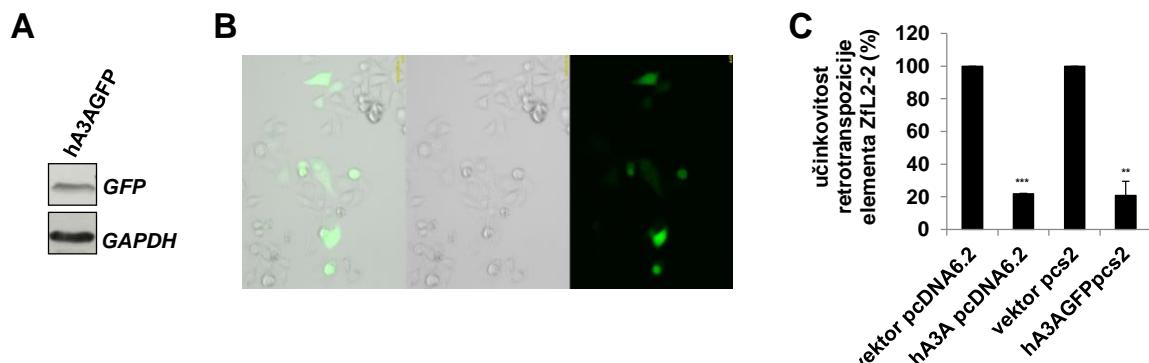
V analiziranih kopijah retrotranspozonskih DNA nismo zaznali porasta števila mutacij G v A, kar nakazuje, da proteini AID/APOBEC, testirani v naši raziskavi, med procesom retrotranspozicije niso povzročili mutacij v novih kopijah retrotranspozonske DNA. Kljub temu, da razgradnje mutiranih kopij s strani gostitelja ne moremo popolnoma izključiti, naši rezultati nakazujejo, da nove kopije DNA retrotranspozonov ZfL2-2 in hL1, ki so nastale v prisotnosti testiranih proteinov AID/APOBEC, niso hipermutirane.

4.6 ANALIZA INTERAKCIJ MED PROTEINI A3 IN RNA V CELICI

Proteini AID/APOBEC so RNA-vezavni proteini (Gallois-Montbrun in sod., 2007; Niewiadomska in sod., 2007; Chiu in Greene, 2008; Lovšin in Peterlin, 2009), ki naj bi bili vpleteni tudi v metabolizem RNA (Wichroski in sod., 2006; Goodier in sod., 2007; Huang in sod., 2007). V naši raziskavi smo se osredotočili na protein hA3A, za katerega je bila že potrjena interakcija z RNA retrotranspozona hL1 (Niewiadomska in sod., 2007). Da bi potrdili njegovo RNA-vezavno aktivnost in posledično identificirali njegove RNA-vezavne partnerje v celici, smo v sodelovanju z laboratorijem dr. Uleta (Cambridge, Velika Britanija) izvedli analizo z metodo CLIP.

4.6.1 Potrjevanje izražanja in funkcionalnosti konstrukta hA3AGFP

Izražanje zapisa za protein hA3A, označen s proteinom GFP, smo najprej potrdili v modelu HEK293T, funkcionalnost oznake GFP pa z analizo celic HeLa, transficiranih s plazmidom z zapisom za konstrukt hA3AGFP, pod epifluorescenčnim mikroskopom. Učinek proteina hA3AGFP na retrotranspozicijo elementa ZfL2-2 je bil primerljiv z učinkom divjega tipa proteina hA3A (slika 30).



Slika 30: Potrjevanje izražanja in funkcionalnosti konstrukta hA3AGFP

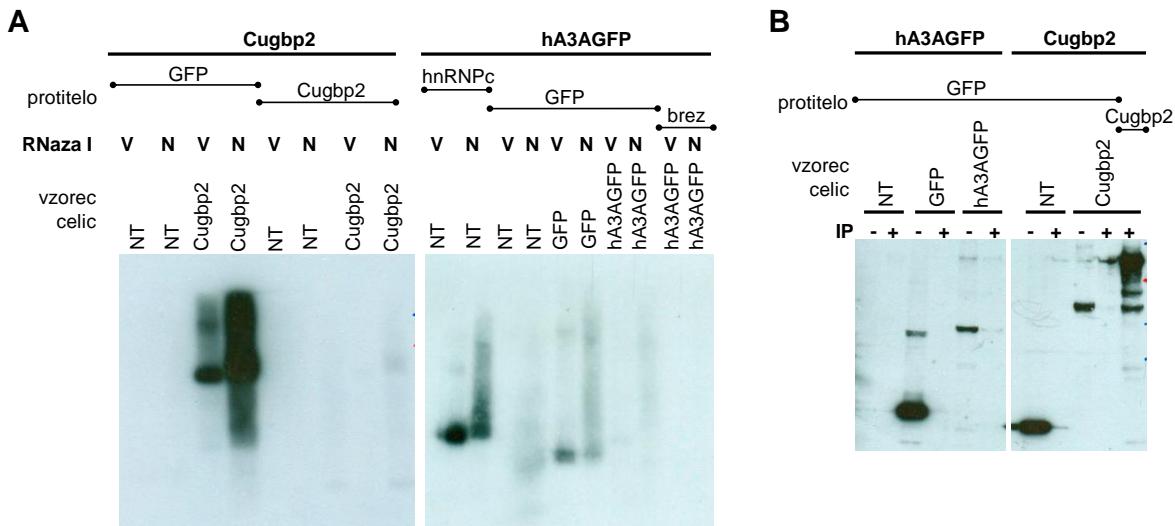
Celice HEK293T (A) ali celice HeLa (B) smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za protein hA3AGFP. A) Izražanje zapisa za protein hA3AGFP smo potrdili s prenosom western in z uporabo protiteles proti oznaki GFP, za kontrolo pa smo uporabili protitelesa proti proteinu GAPDH. (B) Funkcionalnost oznake GFP smo potrdili s pomočjo epifluorescenčnega mikroskopiranja. (C) Celice HeLa smo transficirali z 1 µg plazmida z zapisom za protein hA3AGFP in z 1 µg plazmida z zapisom za retrotranspozon Zfl2-2. Test retrotranspozicije smo izvedli in rezultate obdelali kot je opisano pri sliki 16. Slika prikazuje povprečne vrednosti ± SD za tri neodvisne eksperimente. ***P<0,001, **P<0,01, t-test.

Figure 30: hA3AGFP construct expression and functionality confirmation

HEK293T (A) or HeLa (B) cells were transfected with 1 µg of plasmid encoding the hA3AGFP protein. (A) Transient expression of hA3AGFP protein was confirmed by western blotting using anti-GFP antibody, while GAPDH was used as a loading control. (B) Fluorescent microscopy was used to confirm the GFP-tag functionality of the hA3AGFP protein. (C) HeLa cells were co-transfected with 1 µg of hA3AGFP encoding plasmid and 1 µg of retrotransposon Zfl2-2 plasmid. Retrotransposition assay was performed and results processed as described in Figure 16. Data are the means ± SD for three independent experiments. ***P<0.001, **P<0.01, t-test.

4.6.2 Identifikacija RNA-vezavnih partnerjev proteina hA3A v celici

Celice HeLa, transficirane s plazmidom z zapisom za protein hA3AGFP ali protein GFP, ter kontrolne netransficirane celice smo po 2-dnevni inkubaciji zamrznili in jih poslali v laboratorij dr. Uleta, kjer so naše vzorce analizirali z metodo CLIP. Po ustvarjanju prečnih povezav med proteini in RNA z izpostavljanjem celic UV-svetlobi so celice lizirali, obdelali z DNazo I in RNazo I, ter s celičnimi lizati izvedli imunoprecipitacijo (IP), med katero so RNA radioaktivno označili in nato precipitirane komplekse prenesli na nitrocelulozno membrano, kjer so določili prisotnost radioaktivno označene RNA (slika 31A). Prisotnost RNA so zaznali pri pozitivnih kontrolah, t.j. pri RNA-vezavnih proteinih, ki so jih imunoprecipitirali iz svojih vzorcev celic (protein Cugbp2, označen z GFP), ter iz naših vzorcev (protein hnRNPs). Da se je naš protein hA3AGFP res vezal na protitelesa proti oznaki GFP, so potrdili z analizo lizatov pred in po inkubaciji s protitelesi (slika 31B). Rezultati nakazujejo, da protein hA3AGFP pod našimi eksperimentalnim pogoji ne veže RNA.



Slika 31: Preučevanje sposobnosti proteina hA3AGFP za vezavo RNA z metodo CLIP

(A) prikazuje radioaktivni signal RNA na nitrocelulozni membrani po IP, radioaktivnem označevanju RNA in detekciji z avtoradiografijo, v lizatih različnih celic. (B) prikazuje zmanjšanje količine tarčnih proteinov v lizatu po IP. NT, netransfisirane celice; V, visoka, ali N, nizka koncentracija RNaze I; +, lizat pred IP; -, lizat po IP.

Figure 31: The RNA binding ability of A3A protein as detected by CLIP

(A) shows the radioactive RNA signal detected on nitrocellulose membrane after IP, radioactive RNA labelling and autoradiography in different cell lysates. (B) shows depletion of the target proteins after IP. NT, untransfected cells; V, high, or N, low RNase I concentration; +, lysate before IP; -, lysate after IP.

5 RAZPRAVA

Zaradi svoje integracije v genom so retrotranspozoni običajno škodljivi za svojega gostitelja. Nova integracija se pri človeku zgodi na vsakih 10 do 100 živih rojstev (Kazazian in sod., 1988; Brouha in sod., 2003) in lahko pripelje do razvoja številnih bolezni (Hancks in Kazazian, 2012). Da bi stabilizirali genom, so gostitelji med evolucijo razvili več strategij za omejevanje razmnoževanja transpozicijskih elementov in virusov. Mednje spadajo tudi mutacije s pomočjo preurejanja DNA in/ali RNA, ki jih omogočajo proteini AID/APOBEC. Njihovi učinki so razvidni v genomih človeka in miši, kjer so odkrili številne hipermutacije G v A, ki so značilne za encimsko delovanje proteinov A3. Naše genomske analize razkrivajo, da so hipermutacije G v A prisotne tudi v genomih živali, ki so se v evoluciji razvile pred sesalci, in sicer v genomu zelenega kuščarja anoli, kar kaže na prisotnost encimsko aktivnih proteinov AID/APOBEC (ali drugih deaminaz). Ugotovili smo, da so proteini AID/APOBEC iz testiranih nesesalskih genomov encimsko aktivni, zato so tudi možni hipermutatorji testiranih genomov. Prav tako smo dokazali, da je proteini A1 iz zelenega kuščarja anoli inhibitor retrotranspozicije, kar nakazuje, da se je vloga proteinov AID/APOBEC v obrambi stabilnosti genoma razvila že pri amnionih. Ugotovili smo, da humani proteini A3 inhibirajo tako retrotranspozon L1 kot L2, kar nakazuje, da je njihovo delovanje neodvisno od nukleotidnega zaporedja retrotranspozona in od njihove encimske aktivnosti. Nasprotno so proteini A1, tako kuščarjevi kot humani, inhibirali retrotranspozone, ki nosijo zapis za proteina ORF1p, kar kaže, da se mehanizem delovanja proteinov A1 in A3 proti retrotranspozonom LINE razlikuje.

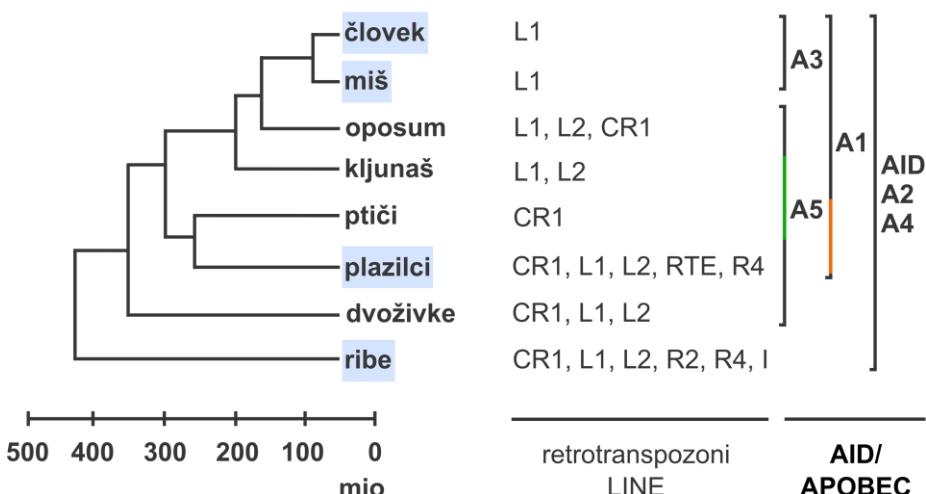
5.1 PRISOTNOSTI HIPERMUTACIJ G V A V NESESALSKIH GENOMIH

Proteini AID/APOBEC so prisotni pri vseh vretenčarjih, vendar pa se njihova distribucija, evolucija in funkcije razlikujejo (slika 32). Dokaze encimskega delovanja proteinov AID/APOBEC, hipermutacije G v A, najdemo v nukleotidnih zaporedjih številnih LTR- in ne-LTR-retrotranspozonov v človeškem in mišjem genomu (Carmi in sod., 2011). Ker pa so proteini AID/APOBEC prisotni tudi pri nesesalskih vretenčarjih, smo v naši raziskavi v sodelovanju z raziskovalci iz univerze Bar-Ilan (Izrael) poskušali identificirati skupke hipermutacij G v A v retrotranspozonih nesesalskih genomov, in sicer v genomu ribe cebrice in zelenega kuščarja anoli (Lindič in sod., 2013). Odkrili smo hipermutacije v kuščarjevih elementih L1 (slika 13), kar je prvi dokaz preurejanja retrotranspozonskih zaporedij v genomih pred sesalci (Lindič in sod., 2013). Čeprav je raven hipermutacij, ki smo jih zaznali v analiziranih genomih, nizka, pa vseeno odraža prisotnost encimsko aktivnih proteinov AID/APOBEC (ali drugih deaminaz) v analiziranih genomih. To potrjujejo tudi rezultati bakterijskih testov mutagenosti, izvedenih v bakteriji *E. coli*, kjer so se proteini AID, A2a in A2b iz ribe cebrice, kuščarjeva proteina A1a (Lindič in sod., 2013) in A1b (Severi in sod., 2011) ter številni drugi vretenčarski proteini AID (MacDuff in sod., 2009) in sesalski A1 (Ikeda in sod., 2011) izkazali kot aktivni mutatorji bakterijske

DNA in bi zato lahko bili povzročitelji hipermutacij, ki smo jih opazili v analiziranih nesesalskih genomih.

Največ hipermutacij G v A med analiziranimi nesesalskimi genomi smo opazili v genomu zelenega kuščarja anoli, in sicer v nukleotidnih zaporedjih elementov L1 (Lindič in sod. 2013), kar je glede na to, da imajo vsi retroelementi v kuščarjevem genomu podobno evolucijsko dinamiko, zelo zanimivo. Številni LTR- in ne-LTR-elementi v genomu kuščarja so namreč še vedno aktivni in zelo raznoliki (Kordiš in sod., 2006; Novick in sod., 2009; Piškurek in sod., 2009), vendar pa so predstavniki posameznih družin prisotni v zelo majhnem številu kopij. To nakazuje, da je stopnja fiksacije novih kopij v genom zelo nizka in da je delovanje gostiteljevih zaščitnih dejavnikov zelo močno. Eden izmed njih bi lahko bil pred kratkim odkriti kuščarjev protein A1 (Severi in sod., 2011), ki v *in vitro* bakterijskem testu kaže močno DNA-mutatorsko aktivnost (Lindič in sod., 2013; Severi in sod., 2011).

Na splošno naše analize niso pokazale velikega števila hipermutiranih retrotranspozonov L1 v analiziranih genomih ribe cebrice in zelenega kuščarja anoli v primerjavi s kontrolnim mišjim genomom. Pri placentalnih sesalcih sta sicer prisotna tako element L1 kot tudi L2, vendar pa je aktiven samo še L1. V skladu s tem so v nukleotidnih zaporedjih placentalnih elementov L1 prisotni številni skupki hipermutacij, še posebno v mišjem genomu, kjer je aktivnih kar 3000 kopij L1 (Goodier in sod., 2001), v primerjavi z človeškim, kjer je takih le 100 (Brouha in sod., 2003). Kljub temu, da smo analizirali zelo veliko število zaporedij, v elementih L2 v analiziranih genomih nismo našli hipermutacij. Možno je sicer, da mutacij nismo mogli zaznati, ker je element L2 pri višjih sesalcih v fazi vertikalne inaktivacije (Lander in sod., 2001; Lovšin in sod., 2001), kar lahko vodi v naključno mutagenezo, zaradi česar z našo metodo, ki išče čiste skupke zaporednih mutacij G v A, slednjih ne bi uspeli zaznati. Zanimivo je, da evolucijska dinamika elementov L2 sovpada z razvojem proteinov A3 (slika 32). Aktivni retrotranspozoni L2 namreč obstajajo pri ribah, dvoživkah, plazilcih in monotremih (Lovšin in sod., 2001; Kajikawa in Okada, 2002; Warren in sod., 2008; Piškurek in sod., 2009; Hellsten in sod., 2010), pri vrečarjih in placentalnih sesalcih pa začneta njihovo število in aktivnost padati, tako da v človeškem genomu najdemo samo še fosilizirane ostanke elementov L2 (Lander in sod., 2001; Lovšin in sod., 2001).



Slika 32: Filogenetski prikaz odnosov med različnimi proteini AID/APOBEC in retrotranspozonskimi družinami LINE pri vretenčarjih

Naraščanje števila proteinov AID/APOBEC sovpada z nižanje raznovrstnosti retrotranspozonov LINE tekom evolucije vretenčarjev. Ena enota na časovni lestvici predstavlja 100 milijonov let (mio). Modra barva ponazarja organizme, katerih genome in proteine AID/APOBEC smo analizirali v naši raziskavi. Oranžna in zelena črta predstavlja sporadično prisotnost proteinov A1 in A5. Podatke za izris drevesa smo povzeli po naši raziskavi in po Lander in sod. (2001), Lovšin in sod. (2001), Conticello in sod. (2005), Rogozin in sod. (2005), Sodergren in sod. (2006), Bohne in sod. (2008), Conticello (2008), Kordiš (2009), Novick in sod. (2009), Piškurek in sod. (2009) in Severi in sod. (2011).

Figure 32: A phylogenetic relationships representation of AID/APOBEC proteins and LINE retrotransponson families in various vertebrates

A rising number of AID/APOBEC family members coincides with the reduction of diversity among the LINE retrotransposons during the vertebrate evolution. Blue marks *in silico* analysed genomes and *ex vivo* AID/APOBEC proteins tested in this study. Orange and green line show sporadic presence of A1 and A5 proteins, respectively. One unit on the timeline represents 100 millions of years (mio). Data was derived from this and from previous studies (Lander in sod., 2001; Lovšin in sod., 2001; Conticello in sod., 2005; Rogozin in sod., 2005; Sodergren in sod., 2006; Bohne in sod., 2008; Conticello, 2008; Kordiš, 2009; Novick in sod., 2009; Piškurek in sod., 2009; Severi in sod., 2011).

V naši raziskavi smo opazili, da človeški proteini A3 inhibirajo retrotranspozon L2 v enaki meri kot hL1, kar nakazuje, da so proteini A3 tekom evolucije inaktivirali elemente L2 v genomih sesalcev, ali pa, da so predniki proteini AID/APOBEC preferenčno inhibirali retrotranspozon L2 pred elementom L1 in je preurejanje sesalskih elementov L1 morda za gostitelja pomenilo neko evolucijsko prednost, zaradi česar se je element L1 tako zelo razširil v genomih sesalcev, medtem ko je bil L2 inaktiviran.

V primerjavi z genomom miši, ki smo ga analizirali za kontrolo, smo v nesesalskih genomih opazili, da je preurejanje LTR-elementov zelo šibko oz. nično (Lindič in sod., 2013). To nakazuje, da inhibicija LTR-elementov z mehanizmom deaminacije prevladuje pri sesalcih, kar potrjujejo tudi analize na novo integriranih kopij LTR-retrotranspozonov v mišjem in človeškem genomu, ki temeljijo na testu retrotranspozicije in kažejo obširne hipermutacije (Esnault in sod., 2008). Možno je seveda, da hipermutacije v nesesalskih

LTR-elementih nismo zaznali zaradi visoke aktivnosti nesesalskih proteinov AID/APOBEC, ki je tekom evolucije vodila v popolno neprepoznavnost ali celo izločitev LTR-elementov iz nesesalskih genomov. Če pa upoštevamo, da imajo sesalski proteini A3 izredno močan zaviralen učinek na retrotranspozicijo endogenih in eksogenih retrovirusov, ki je poleg tega še odvisen od encimske aktivnosti (Chiu in Greene, 2008), lahko sklepamo, da se je aktivnost proteinov AID/APOBEC proti endogenim in eksogenim virusom razvila šele s pojavom sesalcev in doseglja največjo aktivnost pri človeku.

Vzrok za opaženo sporadično hipermutiranje retrotranspozonov v vretenčarskih genomih bi lahko bilo več. Naša metoda analize genomov zaznava samo nedavne dogodke preurejanja DNA okvirne starosti 2 milijona let. Zato bi bila lahko naša izhodiščna nukleotidna zaporedja, ki smo jih uporabili za analizo, že v starejši evolucijski preteklosti mutirana do take mere, da z našo metodo ne moremo več prepoznati hipermutacij G v A. Identificirane hipermutacije so lahko tudi fosilni ostanki dogodkov v preteklosti, zaradi česar inhibitorne aktivnosti proteinov AID/APOBEC ne sovpadajo s hipermutacijami v genomih vretenčarjev. Vzrok je lahko tudi v sporadični prisotnosti nekaterih proteinov AID/APOBEC, kot na primer A1, A4, in A5 (slika 32), ki so prisotni in aktivni samo pri nekaterih vrstah, kar pomeni, da so se pojavili šele pred kratkim, ali pa so se izgubili iz drugih organizmov. Druga možnost pa je, da proteini AID/APOBEC preferenčno oziroma specifično preurejajo samo nukleotidna zaporedja določenih retrotranspozonov, na druga pa delujejo preko od deaminacije neodvisnih mehanizmov, kot nakazuje naša raziskava.

5.2 INHIBITORNA AKTIVNOST PROTEINOV A1 PROTI RETROELEMENTOM IZVIRA PRI AMNIONTIH

Prvi proteini AID/APOBEC se v evoluciji pojavijo pri ribah (slika 32). Pri ribi cebrici so našli protein AID in dve izobliku proteina A2, proteina A2a in A2b, medtem ko proteinov A1 ali A3 ni (Conticello, 2008). Da bi ugotovili, ali inhibitorna aktivnost proteinov AID/APOBEC proti retroelementom obstaja že pri ribah, smo vse proteine AID/APOBEC iz ribe cebrice testirali v *in vitro* testu retrotranspozicije na predstavniku retrotranspozonov L1, elementu hL1, in na predstavnikoma retrotranspozonov L2, elementoma ZfL2-2 in ZfL2-1. Njihova aktivnost proti testiranim elementom LINE je bila zanemarljiva (slika 16), kar sovpada z našimi genomskimi analizami, kjer pri ribi cebrici nismo odkrili signifikantnega števila hipermutacij ne v elementih L1 in tudi ne v elementih L2. Opazili smo sicer rahel učinek proteina zfAID na element hL1, o čemer poročajo že MacDuff in sod. (2009). Ne izključujemo možnosti, da z našim testom retrotranspozicije v sesalski celični liniji nismo uspeli zaznati dejanskega učinka proteinov ribe cebrice na retrotranspozicijo, saj lahko v procesu retrotranspozicije elementa ZfL2-2 vlogo igra tudi gostitelj (Ichiyanagi in sod., 2007). Na žalost pri preliminarnih *in vivo* raziskavah, v katerih smo retrotranspozicijo spremljali ob utišanju izražanja proteinov AID/APOBEC v zarodkih rib cebric, nismo zaznali nobenega dogodka retrotranspozicije (Lovšin, 2010), zato ne

moremo izključiti možnosti, da proteini AID/APOBEC vseeno inhibirajo retrotranspozicijo elementa ZfL2-2 *in vivo*, ali pa inhibirajo druge, pri ribi cebriki aktivne retrotranspozone. Kljub temu pa z ozirom na številne raziskave, kjer so že določili druge fiziološke vloge proteinov zfAID, zfA2a in zfA2b, povezane z razvojem mišic in embrionalnim razvojem, predvsem pa z uravnavanjem izražanja genov (Rai in sod., 2008; Etard in sod., 2010; Vonica in sod., 2011; Abdouni in sod., 2013), naši rezultati nakazujejo, da se je inhibitorna aktivnost proteinov AID/APOBEC razvila kasneje v evoluciji vretenčarjev. Zato smo se osredotočili na naslednji trenutno dostopen protein AID/APOBEC na evolucijski lestvici, nedavno odkriti kuščarjev protein A1 (Severi in sod., 2011). Ugotovili smo, da kuščarjev protein A1 zavira retrotranspozicijo elementa hL1 v celicah HeLa, kar nakazuje, da se je obrambna funkcija proteinov APOBEC razvila že pri plazilcih. Naši rezultati skupaj z dejstvom, da je število v genomu fiksiranih novih kopij retrotranspozonov kljub njihovi visoki in nedavni aktivnosti v kuščarjevem genomu zelo majhno (Novick in sod., 2009), nakazujejo, da v genomu kuščarja obstajajo močni proti retrotranspozonom delujoči mehanizmi, in da je kuščarjev protein A1 morda eden izmed njih. Izraža se namreč v celicah gastrointestinalnega trakta (Severi in sod., 2011), kjer bi lahko kontroliral retrotranspozicijo na somatski ravni. Ker deaminacije mRNA apoB v kuščarjevem črevesju niso opazili, verjetno protein A1 pri kuščarju ne opravlja enake vloge v metabolizmu lipidov kot pri sesalcih (Chester in sod., 2000; Blanc in Davidson, 2010). Za potrditev fiziološke vloge kuščarjevega proteina A1 bodo potrebne nadaljnje raziskave njegovih endogenih tarč ter testiranje njegove aktivnosti proti njemu lastnim retrotranspozonom. Inhibitorno delovanje proteinov A1 proti retrotranspozonu hL1 in nekaterim virusom so odkrili šele pred nedavnim, in še to samo pri sesalcih (Gonzalez in sod., 2009; Ikeda in sod., 2011). Naši rezultati testa retrotranspozicije pa skupaj s potrjeno mutatorsko aktivnostjo kuščarjevega proteina A1 v bakterijskem testu in identificiranimi hipermutacijami G v A v kuščarjevem genomu nakazujejo (Lindič in sod., 2013), da se je zaščitna funkcija proteinov A1 proti retroelementom razvila že pred njihovo funkcijo preurejanja RNA pri sesalcih, t.j., že pri amnionih.

5.3 MEHANIZEM DELOVANJA PROTEINOV A1 IN A3 PROTI RETROTRANSPOZONOM LINE SE RAZLIKUJE

5.3.1 Vpliv prisotnosti retrotranspozonskega proteina ORF1p na delovanje proteinov A1 in A3

Retrotranspozoni za uspešno integracijo v genom večinoma potrebujejo dva proteina, protein ORF2p z endonukleazno in reverzno transkriptazno aktivnostjo, in protein ORF1p. Retrotranspozonski protein ORF1p je RNA-vezavni protein, ki se skupaj z retrotranspozonsko RNA in proteinom ORF2p veže v delce RNP (Doucet in sod., 2010). Vezava proteina ORF1p zaščiti RNA L1 pred napadom nukleaz in pred splošnim metabolizmom mRNA, morda pa tudi preprečuje nastajanje sekundarnih struktur RNA,

oziroma omogoča gladko in neprekinjeno reverzno transkripcijo, ki je ne motijo lokalne strukture RNA (Khazina in sod., 2011; Nakamura in sod., 2012). Glede na to, da interaktom proteina ORF1p kaže prisotnost proteinov, povezanih tako s proteinom A1 kot tudi s proteinimi A3 (Goodier in sod., 2013), smo hoteli ugotoviti, ali je inhibitorno delovanje proteinov A1 in A3 odvisno od prisotnosti proteina ORF1p. Zato smo s testom retrotranspozicije merili njihov učinek na retrotranspozon ZfL2-2, ki ne kodira in za svojo mobilnost ne potrebuje proteina ORF1p, in ga primerjali z učinkom na dva, od proteina ORF1p odvisna retrotranspozona, hL1 in ZfL2-1 (Moran in sod., 1996; Kulpa in Moran, 2005; Sugano in sod., 2006). Ugotovili smo, da je inhibicija elementov LINE s proteinimi A1 za razliko od proteinov A3 odvisna od prisotnosti retrotranspozonskega proteina ORF1p (slike 17 in 18). Glede na to, da je sesalski protein A1 prisoten v delcih RNP hL1 v citoplazmi celic 293T (Ikeda in sod., 2011), je možno, da na proces retrotranspozicije elementa hL1 vpliva preko interakcije z delci RNP. Iz tega lahko sklepamo, da bi odsotnost proteina ORF1p lahko preprečila te interakcije, in tako onemogočila inhibitorno delovanje proteina A1.

Delci RNP vsebujejo tudi retrotranspozonsko RNA. Za protein A1 je že dolgo znano, da veže in preureja mRNA apolipoproteina B (Navaratnam in sod., 1993). Pred kratkim pa so ugotovili, da veže tudi RNA retrotranspozona hL1 in številne druge celične RNA (Ikeda in sod., 2011). Protein A1 se specifično veže na tiste RNA, ki so bogate z nukleotidi AU (Rosenberg in sod., 2011), kakršen je tudi konec 3'-UTR retrotranspozonske RNA (Okada in sod., 1997; Kajikawa in Okada, 2002). Konec 3'-UTR retrotranspozona sicer veže reverzna transkriptaza proteina ORF2p in tam začne reverzno transkripcijo. Zanimivo je, da se specifičnost proteinov ORF2p do svoje lastne RNA pri retrotranspozoni hL1 in ZfL2-2 razlikuje. Protein ORF2p elementa hL1 namreč lahko veže ne samo svojo lastno RNA, temveč tudi druge celične RNA s poli-A-repom, jih mobilizira in tako povzroča nastanek psevdogenov (Esnault in sod., 2000). Nasprotno pa protein ORF2p elementa L2 specifično prepozna samo konec 3'-UTR svoje lastne RNA, s katerim verjetno tvori specifično sekundarno strukturo (Kajikawa in Okada, 2002). Ta specifična interakcija morda prepreči interakcijo proteina A1 s koncem 3'-UTR RNA retrotranspozona L2, in tako tudi njegovo inhibitorno delovanje. Zanimivo je, da vezava A1 na koncem 3'-UTR RNA vpliva tudi na dolgoživost različnih mRNA (Blanc in sod., 2007), poleg tega pa so v človeškem transkriptomu številne, na koncih 3'-UTR hipermutirane tarče RNA proteina A1 (Rosenberg in sod., 2011). Zato je možno, da je protein A1 preko vezave ali mutiranja koncov 3'-UTR RNA vpletjen v mehanizem utišanja z RNAi, saj so tudi tarče mehanizma RNAi pogosto z AU bogati konci 3'-UTR molekul RNA (Robins in Press, 2005), skratka, da je pomemben del regulacijskih mehanizmov izražanja genov.

V nasprotju s proteinimi A1 pa inhibicija retrotranspozicije elementov LINE s proteinimi A3 ni bila odvisna od prisotnosti proteina ORF1p, vsaj ne v primeru proteina A3A (slike 16-19). V skladu z našimi rezultati tudi pretekle raziskave kažejo, da vezava med proteinom

ORF1p elementa hL1 in proteini A3 ni nujna za inhibicijo hL1 (Lovšin in Peterlin, 2009) in da proteini A3 inhibirajo tudi ne-LTR-retrotranspozon Alu neodvisno od prisotnosti proteina ORF1p (Hulme in sod., 2007). Neavtonomni retrotranspozon Alu namreč za svojo retrotranspozicijo potrebuje protein ORF2p elementa hL1, ne pa tudi proteina ORF1p (Dewannieux in sod., 2003), kljub temu pa njegovo retrotranspozicijo proteina A3A in A3B inhibirata v enaki meri kot element hL1 (Bogerd in sod., 2006b; Muckenfuss in sod., 2006; Stenglein in Harris, 2006). Opaženo pa verjetno ne velja za protein A3G, saj le-ta zavira retrotranspozicijo elementa Alu, ne deluje pa proti elementu hL1 (Hulme in sod., 2007). Iz tega je mogoče sklepati, da različni proteini A3 uporabljajo različne mehanizme za zaviranje retrotranspozonov. Morda je to povezano z njihovo lokacijo v celici, saj sta A3A in A3B jedrna proteina, ki posledično verjetno zavirata retrotranspozicijo preko inhibicije reverzne transkripcije in/ali integracije, medtem ko je A3G citoplazemski protein (Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006; Stenglein in Harris, 2006). Tako kot A3A in A3B je tudi A1 jedrni protein, vendar pa je njegovo delovanje za razliko od A3A in A3B vseeno odvisno od prisotnosti proteina ORF1p (Lindič in sod., 2013). To nakazuje, da obstaja še tretji mehanizem inhibicije retrotranspozicije ne-LTR-elementov, ki se razlikuje tako od delovanja proteinov A3A in A3B, kot tudi od A3G. Glede na to, da delci RNP, ki vsebujejo protein A1, za razliko od delcev RNP s proteinom A3G po obdelavi z RNazo ne razpadejo, je morda protein A1 sposoben reagirati z RNA na drugačen način ali pa močneje kot A3G (Ikeda in sod., 2011).

5.3.2 Vpliv lastnosti retrotranspozonov LINE na delovanje proteinov A3

V naši raziskavi smo preučevali tudi učinke različnih humanih proteinov AID/APOBEC na retrotranspozicijo modelnega retrotranspozona ZfL2-2 iz ribe cebrice in jih primerjali z njihovimi učinki na element hL1 in z nekaterimi drugimi predstavniki LINE retrotranspozonov. Najbolj učinkoviti zaviralci našega modelnega retrotranspozona ZfL2-2 so bili humani proteini A3, predvsem proteina A3A in A3B, stopnje inhibicije in mehanizmi (slike 6–9) pa primerljivi s tistimi, ki so jih že določili za element hL1 (Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006; Stenglein in Harris, 2006; Niewiadomska in sod., 2007; Bulliard in sod., 2011). Opazili smo tudi druge podobnosti v mehanizmu inhibicije retrotranspozonov L1 in L2 s proteini A3, ki so podrobnejše obravnavani v nadaljevanju.

5.3.2.1 Pomen encimske aktivnosti proteinov A3 za inhibicijo retrotranspozona ZfL2-2

Čeprav je encimska aktivnost proteinov A3 nujna za inhibicijo LTR-retrotranspozonov, pa ni potrebna za inhibicijo retrotranspozona hL1 (Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006; Niewiadomska in sod., 2007). Podobno kažejo naši rezultati za inhibicijo elementa L2 (Lindič in sod., 2013). V primeru proteina A3A smo namreč ugotovili, da so ohranjeni aminokislinski ostanki v njegovem aktivnem mestu nujni za

inhibicijo retrotranspozicije elementa ZfL2-2 (slika 21). Protein A3A ima samo eno domeno z ohranjenim citidin deaminaznim zaporedjem, kjer ostanek Glu 72 omogoča prenos protona v reakciji deaminacije, ostanka Cys 101 in 106 pa koordinirata ion Zn^{2+} . Mutacija Glu na mestu 72 v proteinu A3A poleg izgube inhibitorne aktivnosti proti retrotranspozonom LINE (Bogerd in sod., 2006b; Lindič in sod., 2013) povzroči izgubo encimske aktivnosti (Bogerd in sod., 2006b), pa tudi sposobnosti vezave hL1 RNA (Niewiadomska in sod., 2007). Možno je tudi, da je ta aminokislinski ostanek pomemben pri zvijanju proteina, saj v primerjavi s homogeno razporeditvijo divjega tipa A3A v celici mutant A3AE72K v celici tvori aggregate (Niewiadomska in sod., 2007). Ker ima protein A3A samo eno domeno CDA, ki je odgovorna tako za vezavo nukleinskih kislin kot tudi za encimsko aktivnost, verjetno spremembra naboja v aktivnem mestu proteina A3A oslabi sposobnost vezave nukleinskih kislin, kar je najbrž bistvenega pomena za inhibicijo retrotranspozicije. Kristalna struktura proteina A3A namreč kaže, da je mesto vezave nukleinskih kislin v neposredni bližini aktivnega mesta (Byeon in sod., 2013). Kljub temu pa tudi mutant A3A F75L, ki ni encimsko aktiven (Narvaiza in sod., 2009), vseeno inhibira retrotranspozicijo elementa ZfL2-2 (slika 21), in replikacijo z adenovirusom povezanega virusa (Narvaiza in sod., 2009). Na osnovi modela proteina A3A so raziskovalci sklepali, da je ima aminokislinski ostanek na mestu 75, ki je usmerjen v notranjost molekule, najbrž večji pomen za stabilnost sekundarne strukture proteina kot pa za vezavo nukleinskih kislin (Bulliard in sod., 2011). Naši rezultati skupaj s prej opaženimi nakazujejo, da je inhibicija elementov LINE s proteinom A3A lahko neodvisna od encimske aktivnosti.

Po filogenetskih analizah aminokislinskih zaporedij sodeč je enodomenski protein A3A v primerjavi z ostalimi proteini A3 najbolj podoben C-končni domeni proteina A3B (Conticello in sod., 2005). Protein A3B je za razliko od proteina A3A sicer sestavljen iz dveh domen z ohranjenim citidin deaminaznim motivom, pri čemer je C-končna domena pomembna za encimsko aktivnost proteina, funkcijo vezave nukleinskih kislin pa opravlja N-končna domena (Bogerd in sod., 2006b), ki je prav tako encimsko aktivna (Bogerd in sod., 2007). Naši rezultati kažejo, da je za inhibitorno delovanja proteina A3B na retrotranspozicije elementa ZfL2-2 potrebna integriteta vsaj ene domene (slika 22), kot so že določili za inhibicijo elementa hL1 (Bogerd in sod., 2006b; Stenglein in Harris, 2006). Protein A3B je sicer jedrni protein, signal za prenos v jedro pa je na N-koncu proteina A3B. Glede na to, da kljub lokaciji v celici obe posamezni domeni vseeno inhibirata tako retrotranspozicijo hL1 kot ZfL2-2, verjetno obstaja več mehanizmov, s katerimi lahko protein A3B zavira retrotranspozicijo elementov LINE (Bogerd in sod., 2006b; Lindič in sod., 2013).

Protein A3B je po aminokislinskem zaporedju zelo podoben proteinu A3G (Conticello in sod., 2005), le da v nasprotju s proteinom A3B ne inhibira retrotranspozicije elementov LINE (Bogerd in sod., 2006b; Lindič in sod., 2013). Razlog je verjetno v celični lokaciji, saj je protein A3G omejen na citoplazmo (Bennett in sod., 2008b), kjer poteka reverzna

transkripcija in sinteza njegovih glavnih tarč, retrovirusov. Za protein A3G velja, da njegov N-konec veže RNA retrovirusa, kar mu omogoča prenos z virusom v novo celico (Huthoff in sod., 2009), njegov encimsko aktivnen C-konec pa veže in deaminira retrovirusno cDNA (Zhang in sod., 2003). Deaminacija virusne cDNA naj bi bila njegov glavni mehanizem protivirusnega delovanja. Protein A3G pa retroviruse lahko inhibira tudi preko mehanizma, ki je neodvisen od encimske aktivnosti (Bishop in sod., 2006), za kar naj ne bi bila potrebna vezava DNA, nujna pa vezava RNA (Belanger in sod., 2013). Za razliko od A3G je protein A3B jedrni protein, v jedru pa poteka reverzna transkripcija in integracija ne-LTR-retrotranspozonov. Ali protein A3B deluje preko vezave retrotranspozonske RNA, bi lahko preučili s testiranjem inhibitorne aktivnosti mutante NA3B z mutiranimi aminokislinskimi ostanki, ki so pomembni za vezavo RNA. Če N-končni del proteina A3B res deluje preko vezave RNA in oviranja sinteze retrotranspozonske cDNA, mutant NA3B z mutiranim vezavnim mestom za RNA ne bi smel inhibirati retrotranspozicije.

5.3.2.2 Vpliv proteinov A3 in A1 na relativno število novih kopij retrotranspozonske DNA

Proteini A3 inhibirajo retrotranspozicijo elementa hL1 preko zniževanja števila novih kopij retrotranspozonske DNA (Stenglein in Harris, 2006; Kinomoto in sod., 2007; Niewiadomska in sod., 2007; Bulliard in sod., 2011). Učinek proteinov AID/APOBEC na relativno število novih kopij ZfL2-2 DNA smo določili s pomnoževanjem fragmentov *neo* brez introna z metodo qPCR (slika 23). Pri proteinih A3 smo opazili, da sta stopnja znižanja inhibicije retrotranspozicije elementa ZfL2-2 pri testu retrotranspozicije (slike 19, 21 in 22) in raven znižanja relativnega števila novih kopij retrotranspozonske DNA (slika 23) v sorazmerju. Iz tega je mogoče sklepati, da proteini A3 ne zavirajo integracije novih kopij elementa ZfL2-2 v genom, oziroma da retrotranspozicijo inhibirajo pred korakom integracije, najbrž med sintezo nove kopije retrotranspozonske DNA, t.j., med reverzno transkripcijo. Možnost, da proteini A3 vplivajo na relativno število retrotranspozonske RNA, smo v skladu z našimi rezultati (slika 25) in prejšnjimi raziskavami vpliva proteinov A3 na relativno količino RNA elementa hL1 (Bulliard in sod., 2011) izključili. Razgradnjo plazmidne DNA, ki naj bi jo posredoval protein A3A (Stenglein in sod., 2010), smo izločili z analizo qPCR plazmidne DNA v vzorcih celotne celične DNA (slika 24). Podobno so pokazale tudi analize učinka proteina A3A na raven plazmida v transficiranih celicah v primerjavi z učinkom na število kopij retrotranspozonske ali virusne DNA (Bulliard in sod., 2011). To pomeni, da je učinek, ki smo ga opazili pri naši qPCR-analizi, posledica delovanja proteinov A3 na relativno število novih kopij retrotranspozonske DNA.

V primerjavi s proteinoma A3A in A3B, ki sta učinkovitost retrotranspozicije in relativno število novih kopij retrotranspozonske DNA znižala do podobne stopnje (slike 19, 21, 22 in 25), pa je bil učinek proteinov A1 na relativno število novih kopij retrotranspozonske

DNA mnogo nižji (slika 26) v primerjavi z njihovimi učinki na uspešnost retrotranspozicije (slika 17). To nakazuje, da proteini A1 vplivajo na proces retrotranspozicije na drugih stopnjah kot proteini A3. Glede na to, da proteini A3 inhibirajo tudi retrotranspozicijo elementa Ty1 pri kvasovkah (Schumacher in sod., 2005), menimo, da proteini A3 inhibirajo proces retrotranspozicije preko evolucijsko ohranjenega, od encimske aktivnosti neodvisnega mehanizma, na stopnji delcev RNP, na stopnji reverzne transkripcije ali na stopnji integracije. Glede na to, da je inhibicija elementov LINE s proteini A1 odvisna od prisotnosti proteina ORF1p (sliki 17 in 18), je možno, da proteini A1 vplivajo na mobilnost delcev RNP, s čimer preprečijo retrotranspozonski RNA dostop do tarčnega mesta.

5.3.2.3 Vpliv proteinov A3 in A1 na nukleotidna zaporedja novih kopij retrotranspozonske DNA

V novih kopijah retrotranspozonov hL1 in ZfL2-2 v prisotnosti proteinov AID/APOBEC, ki smo jih testirali v naši raziskavi, nismo zaznali hipermutacij (slika 29). Podobno so opazili tudi za inhibicijo hL1 (Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006; Ikeda in sod., 2011), kar nakazuje, da v naši raziskavi testirani ribji, kuščarjevi, mišji in človeški proteini AID/APOBEC retrotranspozicije elementov LINE ne inhibirajo z deaminacijo njihove cDNA. Ne moremo sicer izključiti možnosti, da mutirane kopije razgradijo gostiteljevi proteini in s tem preprečijo njihovo integracijo v genom, zaradi česar jih pod našimi eksperimentalnimi pogoji nismo uspeli zaznati. Gostitelj mutacije morda lahko tudi popravi, kot na primer v mutirani virusni cDNA, kjer mutacije C v U prepoznajo in odstranijo encimi popravljalnega mehanizma BER (angl. base excision repair (BER)) (Yang in sod., 2007; Kitamura in sod., 2013). To bi pomenilo, da obstaja dvojni mehanizem inhibicije elementov LINE, deaminacijski in od deaminacijske encimske aktivnosti neodvisen mehanizem. V skladu s tem genomske analize kažejo prisotnost mutacij G v A v vretenčarskih elementih LINE (Carmi in sod., 2011; Lindič in sod., 2013), *in vitro* eksperimenti pa od encimske aktivnosti neodvisno inhibicijo elementov LINE (Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006; Lindič in sod., 2013).

Od encimske aktivnosti odvisen mehanizem je verjetno pomemben pri inhibiciji retrovirusov in njim podobnih LTR-retrotranspozonov (Esnault in sod., 2005; Suspene in sod., 2005; Esnault in sod., 2006; Esnault in sod., 2008; Vartanian in sod., 2010), kjer so že odkrili številne mutacije G v A, pa tudi mutacije C v T, kar nakazuje, da morda delujejo tudi preko deaminiranja molekul RNA. Deaminirano virusno RNA so že zaznali v prisotnosti mišjega proteina A1 (Ikeda in sod., 2008; Petit in sod., 2009) ter človeških proteinov A1 in AID (Liang in sod., 2013). Protein A1 ima v človeškem transkriptomu številne tarče RNA (Rosenberg in sod., 2011), ali je med njimi tudi retrotranspozonska RNA, pa bodo pojasnile analize njenih zaporedij, in raziskave pomena encimske aktivnosti proteina A1 za inhibicijo elementov LINE. Dosedanje raziskave na proteinih A1 pa tako

kot tiste na proteinih A3 že dokazujejo, da je encimska aktivnost proteinov AID/APOBEC potrebna samo za inhibicijo LTR-retrotranspozonov, za inhibicijo elementov L1 pa ne (Bogerd in sod., 2006b; Chen in sod., 2006; Muckenfuss in sod., 2006; Ikeda in sod., 2011), s čimer se ujemajo tudi rezultati naših analiz nukleotidnih zaporedij novih kopij DNA testiranih retrotranspozonov (Lindič in sod., 2013).

5.4 PROTEINI A3 IN VEZAVA RNA

Proteini A3 so RNA-vezavni proteini, pri katerih je večina interakcij z drugimi proteini odvisna od vezave molekul RNA (Gallois-Montbrun in sod., 2008; Lovšin in Peterlin, 2009; Stauch in sod., 2009; Liu in sod., 2012). V naši raziskavi smo tarčne molekule RNA proteina A3A poskušali identificirati s pomočjo metode CLIP, ki so jo z našimi vzorci izvedli sodelavci iz laboratorija dr. Uleta (Cambridge, Velika Britanija). Metodo CLIP smo izbrali zato, ker omogoča specifično identifikacijo vseh RNA, ki jih preiskovani protein veže pri pogojih *in vivo*, in ker z njo lahko določimo tudi točno mesto interakcije na molekuli RNA. V celicah, ki jih obsevamo z UV-svetlobo, namreč pride do nastanka kovalentne vezi med molekulo proteina in delom RNA, ki je v neposredni bližini (Greenberg, 1979), zato lahko preostalo RNA razgradimo z RNazo, z izvedbo koimunoprecipitacije pri ostrih pogojih pa močno zmanjšamo možnost lažno pozitivnih rezultatov (Ule in sod., 2003). Na žalost nam z metodo CLIP vezave med proteinom A3A in RNA ni uspelo zaznati (slika 31), čeprav je bila interakcija med RNA retrotranspozona hL1 ter nekaterimi drugimi RNA in proteinom A3A že dokazana s koimunoprecipitacijo (Niewiadomska in sod., 2007; Ikeda in sod., 2011). Naš neuspeh je lahko posledica uporabe proteinske oznake GFP, ki smo jo pripeli na protein A3A. Čeprav je protein A3AGFP inhibiral retrotranspozicijo elementa ZfL2-2 do enake mere kot protein A3A divjega tipa (slika 30), lahko oznaka GFP ovira normalno delovanje proteina (Landgraf in sod., 2012), v našem primeru vezavo RNA, ali pa oligomerizacijo proteina A3A. Za vezavo RNA naj bi bila na primer pri proteinu A3C, ki ima tako kot protein A3A samo eno domeno, potrebna dimerizacija (Stauch in sod., 2009). Šele razrešitev strukture proteina A3 skupaj s substratom bo razjasnila, kako ti encimi vežejo polinukleotidni substrat, če, in kako, vezava vpliva na oligomerizacijo proteinov, pa tudi, ali obstajajo razlike med vezavo molekul enoverižne DNA in RNA. Protein A3A ima *in vitro* sicer v primerjavi s proteinom A3G 1000-krat šibkejšo afiniteto do enoverižne DNA (Byeon in sod., 2013). V skladu s tem je bila tudi količina kopij RNA različnih celičnih RNA in tudi RNA retrotranspozona hL1, ki so koimunoprecipitirali s proteini hA1, hA3A in hA3G, pri enodomenskih proteinih veliko manjša kot pri proteinu hA3G, kar nakazuje, da je interakcija enodomenskih proteinov šibkejša/drugačna, kot pri tistih proteinih A3, ki imajo dve domeni (Huthoff in sod., 2009; Ikeda in sod., 2011). V raziskavi vezave retrovirusne RNA so ugotovili, da proteinu A3A manjka domena, ki bi mu omogočala vezavo virusne RNA (Goila-Gaur in sod., 2007). Protein A3A je namreč bolj soroden encimsko aktivnemu C-koncu proteina A3G (Conticello in sod., 2005), medtem ko je mesto za vezavo RNA na

encimsko neaktivem N-koncu proteina A3G (Belanger in sod., 2013). Iz istega razloga naj protein A3A ne bi bil sposoben vezave na retrovirusno RNA, posledično pa tudi ne funkcionalnega vključevanja v virione in zaviranja virusa HIV-1. Himeri proteina A3A in N-konca proteina A3G se namreč povrne protivirusna aktivnost (Goila-Gaur in sod., 2007).

Zato bi bilo dobro metodo CLIP preizkusiti s proteinom A3A, ki bi ga označili z manjšo proteinsko oznako, še bolje pa raziskavo izvesti na endogenem proteinu A3A iz fiziološko relevantnih celic in z uporabo protiteles, specifičnih za protein A3A. Naše preliminarne raziskave vezave med proteinom A3A, označenim z oznako HA, in RNA retrotranspozona ZfL2-2, kjer smo kot reverzibilni prečni povezovalec namesto UV-svetlobe uporabili formaldehid po metodi Niranjanakumari in sod. (2002), sicer ne kažejo ponovljivih rezultatov, zato bo potrebno našo metodo, kot tudi metodo CLIP, optimizirati. Potrditev in določevanje točnega mesta vezave RNA ima kritično vrednost za razumevanje pomena vezave med proteini A3 in njihovimi tarčnimi RNA *in vivo*. Če namreč pride do vezave RNA na mestu introna, to nakazuje jedrno vlogo RNA-vezavnega proteina, na primer pri uravnavanju alternativnega izrezovanja in spajanja, vezava konca 3'-UTR RNA pa nakazuje vlogo proteina v citoplazmi, na primer pri kontroli lokalizacije ali translacije RNA, medtem ko vezava malih nekodirajočih RNA nakazuje vpletost v mehanizem utišanja z RNAi. Med proteini gostitelja, ki so vpleteni v omenjene regulacijske mehanizme RNA, pa so že odkrili skupne tarče proteinov A3 in retrotranspozonskih proteinov ORF1p (Goodier in sod., 2007; Dai in sod., 2012; Goodier in sod., 2013).

6 SKLEPI

Naše genomske analize razkrivajo, da so hipermutacije G v A prisotne tudi v nesesalskih genomih, in sicer v retrotranspozonskih nukleotidnih zaporedjih zelenega kuščarja anoli, in nakazujejo prisotnost citidin deaminaznih mehanizmov, ki te organizme ščitijo pred škodljivimi učinki retrotranspozicije.

S testom mutagenosti v bakterijah smo potrdili, da so proteini AID/APOBEC, ki so prisotni v analiziranih nesesalskih genomih, encimsko aktivni in bi zato lahko bili povzročitelji identificiranih genomskeih hipermutacij.

Inhibitorno delovanje proteinov AID/APOBEC iz analiziranih nesesalskih genomov proti retrotranspozonom smo preverili s testom retrotranspozicije v celičnih kulturah, kjer smo zaznali, da kuščarjev protein A1 inhibira retrotranspozicijo elementa L1. Iz tega sklepamo, da se je aktivnost proteinov A1 proti retroelementom razvila že pri amnionih.

S primerjavo učinkov kuščarjevih in humanih proteinov A1 na retrotranspozicijo različnih elementov LINE smo ugotovili, da proteini A1 inhibirajo samo tiste, ki nosijo zapis za protein ORF1p, medtem ko proteini A3 delujejo neodvisno od proteina ORF1p, kar kaže na različen mehanizem delovanja proteinov A1 in A3 proti elementom LINE.

Evolucijsko ohranjenost delovanja proteinov A3 proti elementom LINE smo potrdili z merjenjem učinka človeških proteinov A3 na retrotranspozona L2 iz ribe cebrice in jegulje. Opazili smo, da je njihov učinek primerljiv z učinkom na človeški element L1. To nakazuje, da so se proteini A3 pri sesalcih razvili za obrambo proti retroelementom, naš sklep pa dodatno potrjuje tudi od prisotnosti proteina ORF1p neodvisno delovanje proteinov A3.

Ugotovili smo, da inhibitorno delovanje proteinov A3 na retrotranspozicijo elementov LINE ne vključuje deaminiranja novih kopij retrotranspozonske DNA in da je neodvisno od nukleotidnega zaporedja retrotranspozona ali encimske aktivnost proteinov A3, je pa za njihovo delovanje potrebna integriteta aktivnega mesta. To smo dokazali s sekvenciranjem novih kopij retrotranspozona L2 in testiranjem encimskih mutant proteinov A3.

Z metodo qPCR smo ugotovili, da mehanizem inhibicije retrotranspozona L2 s proteini A3 vključuje zniževanje relativnega števila novih kopij retrotranspozonske DNA. Iz tega sledi, da proteini A3 zavirajo elemente L2 na stopnji prenosa retrotranspozonske RNA v jedro ali pa med reverzno transkripcijo. To nakazuje interakcijo med proteini A3 in RNA, ki pa nam je z metodo CLIP ni uspelo potrditi.

Opažene razlike med učinki proteinov A3 in A1 na elemente LINE nakazujejo, da so se različni proteini AID/APOBEC razvili za inhibicijo različnih razredov retrotranspozonov. Razlike v aktivnosti proteinov AID/APOBEC proti retrotranspozonom LINE se skladajo s preferenčnim preurejanjem elementov LINE, ki smo ga zaznali v vretenčarskih genomih, kar nakazuje, da so posamezni retrotranspozoni tekom evolucije hipermutirali do različne mere in preferenčno pred drugimi.

Odsotnost hipermutacij v novih kopijah DNA retrotranspozonov L2 in L1, ki so nastale v prisotnosti v naši raziskavi testiranih ribjih, kuščarjevih, mišjih in človeških proteinov AID/APOBEC, nakazuje od deaminacije neodvisno inhibicijo retrotranspozicije elementov LINE, ki jo dodatno potrjujejo nizke stopnje preurejanja retrotranspozonov LINE pri vretenčarjih ter nizka stopnja fiksacije elementov LINE v vretenčarskih genomih.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Proteini AID/APOBEC so citidin deaminaze, ki so se razvile za obrambo proti škodljivim učinkom retroelementov. Odtisi njihove encimske aktivnosti so prisotni v številnih hipermutiranih retroelementih v sesalskih genomih. Ti skupki mutacij G v A so končni produkt deaminacije C v U na novo nastali molekuli DNA retroelementa, prepisani iz RNA z reverzno transkripcijo. Člani proteinske družine AID/APOBEC niso prisotni samo pri sesalcih, temveč po vsej liniji vretenčarjev. Delovanje nesesalskih proteinov AID/APOBEC proti retroelementom je še dokaj neraziskano. V naši raziskavi smo našli odtise citidin deaminazne aktivnosti v retroelementih nesesalskih vretenčarskih genomov. Z analizo genomov ribe cebrice in zelenega kuščarja anoli smo identificirali hipermutacije v kuščarjevih elementih L1. Potrdili smo tudi, da so proteini AID/APOBEC, kodirani v analiziranih genomih, in sicer proteina A2b in AID iz ribe cebrice, še posebno pa kuščarjev protein A1, aktivne citidin deaminaze. To nakazuje, da bi lahko bili povzročitelji hipermutacij v analiziranih genomih. Njihov učinek na retroelemente smo preverili s testom retrotranspozicije v celicah HeLa. Učinka proteinov AID/APOBEC iz ribe cebrice na humani element L1 (hL1) in elementa L2 iz ribe cebrice (ZfL2-2 in ZfL2-1) nam ni uspelo zaznati, kar se sklada z rezultati genomskeh analiz, kjer nismo našli hipermutacij v elementih L1 in L2 genoma ribe cebrice. Nasprotno pa je testiranje evolucijsko mlajšega sorodnika ribjih proteinov AID/APOBEC, proteina A1 iz zelenega kuščarja anoli, pokazalo, da slednji inhibira retrotranspozicijo elementov hL1 in ZfL2-1, ne pa tudi elementa ZfL2-2. Primerjava inhibitornega delovanja kuščarjevega proteina A1 s človeškim proteinom A1 je pokazala enak učinek na inhibicijo elementov LINE. Glavna razlika med testiranimi elementi LINE je v tem, da edino element ZfL2-2 ne kodira proteina ORF1p, iz česar smo sklepali, da je inhibicija elementov LINE s proteini A1 odvisna od prisotnosti retrotranspozonskega proteina ORF1p. Ko smo učinke proteinov A1 primerjali s proteini A3, smo opazili, da proteini A3 inhibirajo tako elementa hL1 in ZfL2-1, ki nosita zapis za protein ORF1p, kot tudi element ZfL2-2 brez proteina ORF1p, kar nakazuje, da je inhibitorna aktivnost proteinov A3 proti retrotranspozonom LINE neodvisna od nukleotidnega zaporedja in strukture retrotranspozona. Ker proteini A3 lahko inhibirajo retrotranspozicijo elementa hL1 neodvisno od encimske aktivnosti, smo hoteli ugotoviti, ali so podobne katalitične lastnosti humanih proteinov A3 potrebne tudi za zaviranje elementa ZfL2-2. Ugotovili smo, da so ohranjeni aminokislinski ostanki v aktivnem mestu humanega proteina A3A nujni za uspešno inhibicijo retrotranspozona ZfL2-2, vendar pa encimska aktivnost ni potrebna. Podobno smo tudi v primeru humanega proteina A3B opazili, da je za inhibicijo elementa ZfL2-2 nujna integriteta vsaj ene domene. Kot je že bilo opaženo pri inhibiciji elementa hL1, sta tudi v primeru elementa ZfL2-2 proteina A3A in A3B znižala relativno število novih kopij DNA retrotranspozona, kar nakazuje, da proteini A3 inhibirajo retrotranspozicijo elementa ZfL2-2 pred integracijo.

Nasprotno pa je bil učinek testiranih proteinov A1 na relativno število novih kopij DNA elementa hL1 mnogo manjši kot njihov učinek na uspešnost retrotranspozicije, kar nakazuje, da inhibicija elementa hL1 s proteinimi A1 ne vključuje vpliva na stabilnost retrotranspozonske DNA. Čeprav bodo za preučitev možnosti vpliva proteinov AID/APOBEC na retrotranspozicijo preko interakcije z njihovo RNA ali vpliv na metabolizem RNA potrebne nadaljnje raziskave, pa naši rezultati ne kažejo vpliva proteinov AID/APOBEC na relativno število retrotranspozonske RNA. Tudi hipermutacij v novih kopijah DNA retrotranspozona ZfL2-2, ki bi nastale v prisotnosti testiranih proteinov AID/APOBEC, nismo zaznali, iz česar sklepamo, da preurejanje retrotranspozonske DNA za zaviranje elementov ZfL2-2 in hL1 ni potrebno. Iz tega izhaja, da so proteini AID/APOBEC vplivali na evolucijsko dinamiko elementov L2 brez hipermutiranja DNA. Naša raziskava torej nakazuje, da za inhibicijo elementov LINE obstaja od encimske aktivnosti neodvisen mehanizem delovanja proteinov AID/APOBEC in da proteini A1 in A3 za inhibicijo elementov LINE uporabljajo različne mehanizme. Skupaj s hipermutacijami, ki smo jih zaznali v vretenčarskih elementih LINE, naša raziskava nakazuje, da inhibitorna aktivnost proteinov AID/APOBEC proti retroelementom izvira pri zgodnjih vretenčarjih. Naša odkritja odpirajo nove perspektive v raziskavah nesesalskih proteinov AID/APOBEC in pomembno prispevajo k razumevanju inhibitornega mehanizma proteinov AID/APOBEC proti elementom LINE in njihovega vpliva na evolucijo retrotranspozonov in s tem genomov vretenčarjev.

7.2 SUMMARY

AID/APOBEC proteins are cytidine deaminases that evolved to protect cells against harmful effects of retroelements. Their enzymatic activity is evident from numerous hyperedited retroelements present in mammalian genomes. These clusters of G to A mismatches between the reference genome and the edited sequence are the final product of deamination of C into U in the newly formed retroelement DNA after reverse transcription. Notably, AID/APOBEC protein family members are present not only in mammals, but throughout the vertebrate lineage, and the anti-retroelement activity of non-mammalian AID/APOBEC proteins is largely unknown. We found proofs of cytidine deaminase activity in retroelements of non-mammalian vertebrate genomes. Using genome-wide analysis of zebrafish and green anole lizard genomes we identified editing in the lizard L1 elements. Next, we confirmed that the AID/APOBEC proteins present in the analysed genomes, namely zebrafish A2b, zebrafish AID and, foremost lizard A1 proteins, are potent DNA mutators. Hence, they are possible editors of the analysed vertebrate genomes. To test their effect on anti-retroelement activity, we employed the proteins in *ex vivo* *neo*-based retrotransposition assays in HeLa cells. We did not detect any effect of zebrafish AID/APOBEC proteins on the human L1 (hL1) or zebrafish L2 (ZfL2-2 and ZfL2-1) retrotransposons. This negative result is in accordance with the negligible editing rate detected in L1 and L2 elements in the zebrafish genome. However, when the evolutionary

younger relative of zebrafish AID/APOBEC proteins, the green anole lizard A1 protein, was tested, we observed that it potently inhibits the hL1, but not the ZfL2-2 retrotransposon. By comparing its anti-retroelement effect with that of the human A1 protein, the same differential inhibition of LINE elements was observed. The major difference between all three tested LINE elements is the absence of the ORF1p protein in the ZfL2-2 element, which led us to hypothesize that the inhibition of LINE retrotransposition by A1 proteins is ORF1p-dependent. When the effect of A1 proteins was compared with that of A3 proteins, we found that the latter inhibit all three LINE elements, implying that the inhibitory activity of A3 proteins against LINE retrotransposons is sequence- and structure-independent. We next asked ourselves whether enzymatic activity of A3 proteins is important for their inhibitory activity against the ZfL2-2 element. We found that the conserved amino acid residues in the active site of the human A3A protein are required for successful inhibition of ZfL2-2 retrotransposition, but enzymatic activity is not necessary. On the other hand, the integrity of at least one domain of the human A3B protein was required for ZfL2-2 element inhibition. Human A3A and A3B proteins decreased the relative number of *de novo* ZfL2-2 DNA copies, as observed previously for novel hL1 copies, which implies that the inhibition of ZfL2-2 retrotransposon takes place before integration. On the other hand, the effect of the tested A1 proteins on the relative number of novel hL1 DNA copies was much lower in comparison with their effect on hL1 inhibition, implying that its inhibition occurs at the step of integration, or by interference with retrotransposon RNP particles. Even though further studies are needed to show whether the AID/APOBEC proteins inhibit retrotransposition by interacting with RNA and affect the RNA metabolism, our results show no notable effect of APOBEC proteins on the relative number of retrotransposon RNA. In addition, no hyperediting of novel retrotransposon ZfL2-2 DNA copies was detected. In fact, according to our experimental results, DNA editing is not necessary for the restriction of ZfL2-2 and hL1 elements by the AID/APOBEC proteins tested here, implying that the AID/APOBEC proteins may have impacted the evolutionary dynamics of L2 elements without DNA editing. Altogether, our results suggest the existence of an editing-independent mechanism of AID/APOBEC activity against LINE retrotransposons, and that A1 and A3 proteins employ different mechanism(s) for the inhibition of LINE retrotransposition. Together with the editing detected in vertebrate LINE elements, our study indicates that AID/APOBEC anti-retroelement activity probably originates in early vertebrates. Our findings open new perspectives in non-mammalian AID/APOBEC protein research and are an important contribution to our understanding of the mechanism used by AID/APOBEC proteins to inhibit LINE elements and of their impact on the evolution of retrotransposons and of vertebrate genomes.

8 VIRI

- Abdouni H., King J. J., Suliman M., Quinlan M., Fifield H., Larijani M. 2013. Zebrafish AID is capable of deaminating methylated deoxycytidines. *Nucleic Acids Research*, 41, 10: 5457–5468
- Abe H., Ochi H., Maekawa T., Hatakeyama T., Tsuge M., Kitamura S., Kimura T., Miki D., Mitsui F., Hiraga N., Imamura M., Fujimoto Y., Takahashi S., Nakamura Y., Kumada H., Chayama K. 2009. Effects of structural variations of APOBEC3A and APOBEC3B genes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology Research*, 39, 12: 1159-1168
- Aguiar R. S., Peterlin B. M. 2008. APOBEC3 proteins and reverse transcription. *Virus Research*, 134, 1-2: 74-85
- Alexandrova E. A., Olovnikov I. A., Malakhova G. V., Zabolotneva A. A., Suntsova M. V., Dmitriev S. E., Buzdin A. A. 2012. Sense transcripts originated from an internal part of the human retrotransposon LINE-1 5' UTR. *Gene*, 511, 1: 46-53
- Aoufouchi S., Faili A., Zober C., D'Orlando O., Weller S., Weill J. C., Reynaud C. A. 2008. Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *Journal of Experimental Medicine*, 205, 6: 1357-1368
- Arias J. F., Koyama T., Kinomoto M., Tokunaga K. 2012. Retroelements versus APOBEC3 family members: No great escape from the magnificent seven. *Frontiers in Microbiology*, 3: 275 [1-12] doi: 10.3389/fmicb.2012.00275
- Arjan-Odedra S., Swanson C. M., Sherer N. M., Wolinsky S. M., Malim M. H. 2012. Endogenous MOV10 inhibits the retrotransposition of endogenous retroelements but not the replication of exogenous retroviruses. *Retrovirology*, 8, 10: e1002941 [1-14] doi: 10.1371/journal.pgen.1002941
- Athanikar J. N., Badge R. M., Moran J. V. 2004. A YY1-binding site is required for accurate human LINE-1 transcription initiation. *Nucleic Acids Research*, 32, 13: 3846-3855
- Baillie J. K., Barnett M. W., Upton K. R., Gerhardt D. J., Richmond T. A., De Sario F., Brennan P. M., Rizzu P., Smith S., Fell M., Talbot R. T., Gustincich S., Freeman T. C., Mattick J. S., Hume D. A., Heutink P., Carninci P., Jeddelloh J. A., Faulkner G. J. 2011. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature*, 479, 7374: 534-537
- Barlow D. P. 1993. Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? *Science*, 260, 5106: 309-310
- Basame S., Wai-lun Li P., Howard G., Branciforte D., Keller D., Martin S. L. 2006. Spatial assembly and RNA binding stoichiometry of a LINE-1 protein essential for retrotransposition. *Journal of Molecular Biology*, 357, 2: 351-357
- Beale R. C., Petersen-Mahrt S. K., Watt I. N., Harris R. S., Rada C., Neuberger M. S. 2004. Comparison of the differential context-dependence of DNA deamination by APOBEC enzymes: correlation with mutation spectra in vivo. *Journal of Molecular Biology*, 337, 3: 585-596
- Becker K. G., Swergold G. D., Ozato K., Thayer R. E. 1993. Binding of the ubiquitous nuclear transcription factor YY1 to a cis regulatory sequence in the human LINE-1 transposable element. *Human Molecular Genetics*, 2, 10: 1697-1702

- Belanger K., Savoie M., Rosales Gerpe M. C., Couture J. F., Langlois M. A. 2013. Binding of RNA by APOBEC3G controls deamination-independent restriction of retroviruses. *Nucleic Acids Research*, 41, 15: 7438-7452
- Bennett E. A., Keller H., Mills R. E., Schmidt S., Moran J. V., Weichenrieder O., Devine S. E. 2008a. Active Alu retrotransposons in the human genome. *Genome Research*, 18, 12: 1875-1883
- Bennett R. P., Presnyak V., Wedekind J. E., Smith H. C. 2008b. Nuclear Exclusion of the HIV-1 host defense factor APOBEC3G requires a novel cytoplasmic retention signal and is not dependent on RNA binding. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 12: 7320-7327
- Beraldi R., Pittoggi C., Sciamanna I., Mattei E., Spadafora C. 2006. Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 3: 279-287
- Berger A., Munk C., Schweizer M., Cichutek K., Schule S., Flory E. 2010. Interaction of Vpx and apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide 3 family member A (APOBEC3A) correlates with efficient lentivirus infection of monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 16: 12248-12254
- Bishop K. N., Holmes R. K., Malim M. H. 2006. Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *Journal of Virology*, 80, 17: 8450-8458
- Bishop K. N., Holmes R. K., Sheehy A. M., Davidson N. O., Cho S. J., Malim M. H. 2004a. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Current Biology*, 14, 15: 1392-1396
- Bishop K. N., Holmes R. K., Sheehy A. M., Malim M. H. 2004b. APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science*, 305, 5684: 645-645
- Bishop K. N., Verma M., Kim E. Y., Wolinsky S. M., Malim M. H. 2008. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathogens*, 4, 12: e1000231 [1-11]
doi:10.1371/journal.ppat.1000231
- Blanc V., Davidson N. O. 2010. APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 2, 5: 594-602
- Blanc V., Henderson J. O., Newberry R. D., Xie Y., Cho S. J., Newberry E. P., Kennedy S., Rubin D. C., Wang H. L., Luo J., Davidson N. O. 2007. Deletion of the AU-rich RNA binding protein Apobec-1 reduces intestinal tumor burden in Apc(min) mice. *Cancer Research*, 67, 18: 8565-8573
- 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, 2: 486-493
- Bogerd H. P., Wiegand H. L., Doeble B. P., Lueders K. K., Cullen B. R. 2006a. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Research*, 34, 1: 89-95
- Bogerd H. P., Wiegand H. L., Hulme A. E., Garcia-Perez J. L., O'Shea K. S., Moran J. V., Cullen B. R. 2006b. Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 23: 8780-8785
- Bohn M. F., Shandilya S. M., Albin J. S., Kouno T., Anderson B. D., McDougle R. M., Carpenter M. A., Rathore A., Evans L., Davis A. N., Zhang J., Lu Y., Somasundaran M., Matsuo H., Harris R. S., Schiffer C. A. 2013. Crystal Structure of the DNA Cytosine Deaminase APOBEC3F: The Catalytically Active and HIV-1 Vif-Binding Domain. *Structure*, 21, 6: 1042-1050

- Bohne A., Brunet F., Galiana-Arnoux D., Schultheis C., Wolff J. N. 2008. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research*, 16, 1: 203-215
- Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Hasler K., Fleckenstein B., Schaffner W. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 41, 2: 521-530
- Bourc'his D., Bestor T. H. 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, 431, 7004: 96-99
- Brar S. S., Sacho E. J., Tessmer I., Croteau D. L., Erie D. A., Diaz M. 2008. Activation-induced deaminase, AID, is catalytically active as a monomer on single-stranded DNA. *DNA Repair*, 7, 1: 77-87
- Brouha B., Schustak J., Badge R. M., Lutz-Prigge S., Farley A. H., Moran J. V., Kazazian H. H., Jr. 2003. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9: 5280-5285
- Bulliard Y., Narvaiza I., Bertero A., Peddi S., Rohrig U. F., Ortiz M., Zoete V., Castro-Diaz N., Turelli P., Telenti A., Michielin O., Weitzman M. D., Trono D. 2011. Structure-function analyses point to a polynucleotide-accommodating groove essential for APOBEC3A restriction activities. *Journal of Virology*, 85, 4: 1765-1776
- Burnett A., Spearman P. 2007. APOBEC3G multimers are recruited to the plasma membrane for packaging into human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles in an RNA-dependent process requiring the NC basic linker. *Journal of Virology*, 81, 10: 5000-5013
- Burns M. B., Lackey L., Carpenter M. A., Rathore A., Land A. M., Leonard B., Refsland E. W., Kotandenya D., Tretyakova N., Nikas J. B., Yee D., Temiz N. A., Donohue D. E., McDougle R. M., Brown W. L., Law E. K., Harris R. S. 2013. APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature*, 494, 7437: 366-370
- Byeon I. J., Ahn J., Mitra M., Byeon C. H., Hercik K., Hritz J., Charlton L. M., Levin J. G., Gronenborn A. M. 2013. NMR structure of human restriction factor APOBEC3A reveals substrate binding and enzyme specificity. *Nature Communications*, 4: 1890 [1-23]
doi:10.1038/ncomms2883
- Carmi S., Church G. M., Levanon E. Y. 2011. Large-scale DNA editing of retrotransposons accelerates mammalian genome evolution. *Nature Communications*, 2: 519 [1-6]
doi:10.1038/ncomms1525
- Cen S., Guo F., Niu M., Saadatmand J., Deflassieux J., Kleiman L. 2004. The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 32: 33177-33184
- Chaipan C., Smith J. L., Hu W. S., Pathak V. K. 2013. APOBEC3G restricts HIV-1 to a greater extent than APOBEC3F and APOBEC3DE in human primary CD4+ T cells and macrophages. *Journal of Virology*, 87, 1: 444-453
- Chelico L., Pham P., Calabrese P., Goodman M. F. 2006. APOBEC3G DNA deaminase acts processively 3' -> 5' on single-stranded DNA. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13, 5: 392-399
- Chelico L., Prochnow C., Erie D. A., Chen X. S., Goodman M. F. 2010. Structural model for deoxycytidine deamination mechanisms of the HIV-1 inactivation enzyme APOBEC3G. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 21: 16195-16205
- 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. *Current Biology*, 16, 5: 480-485

- Chen K. M., Harjes E., Gross P. J., Fahmy A., Lu Y., Shindo K., Harris R. S., Matsuo H. 2008. Structure of the DNA deaminase domain of the HIV-1 restriction factor APOBEC3G. *Nature*, 452, 7183: 116-119
- Chester A., Scott J., Anant S., Navaratnam N. 2000. RNA editing: cytidine to uridine conversion in apolipoprotein B mRNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1494, 1-2: 1-13
- 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
- Conticello S. G. 2008. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biology*, 9, 6: 229 [1-10] doi:10.1186/gb-2008-9-6-229
- Conticello S. G. 2012. Creative deaminases, self-inflicted damage, and genome evolution. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1267: 79-85
- Conticello S. G., Langlois M. A., Neuberger M. S. 2007. Insights into DNA deaminases. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14, 1: 7-9
- 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. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 2: 367-377
- Cordaux R., Batzer M. A. 2009. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Reviews. Genetics*, 10, 10: 691-703
- Cost G. J., Boeke J. D. 1998. Targeting of human retrotransposon integration is directed by the specificity of the L1 endonuclease for regions of unusual DNA structure. *Biochemistry*, 37, 51: 18081-18093
- Cost G. J., Feng Q., Jacquier A., Boeke J. D. 2002. Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO Journal*, 21, 21: 5899-5910
- Coufal N. G., Garcia-Perez J. L., Peng G. E., Yeo G. W., Mu Y., Lovci M. T., Morell M., O'Shea K. S., Moran J. V., Gage F. H. 2009. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature*, 460, 7259: 1127-1131
- Dai L., Taylor M. S., O'Donnell K. A., Boeke J. D. 2012. Poly(A) binding protein C1 is essential for efficient L1 retrotransposition and affects L1 RNP formation. *Molecular and Cellular Biology*, 32, 21: 4323-4336
- Dang Y., Siew L. M., Wang X., Han Y., Lampen R., Zheng Y. H. 2008. Human cytidine deaminase APOBEC3H restricts HIV-1 replication. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 17: 11606-11614
- Dang Y., Wang X., Esselman W. J., Zheng Y. H. 2006. Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *Journal of Virology*, 80, 21: 10522-10533
- Deininger P. L., Moran J. V., Batzer M. A., Kazazian H. H., Jr. 2003. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current Opinion in Genetics and Development*, 13, 6: 651-658
- Delker R. K., Fugmann S. D., Papavasiliou F. N. 2009. A coming-of-age story: activation-induced cytidine deaminase turns 10. *Nature Immunology*, 10, 11: 1147-1153
- Dewannieux M., Esnault C., Heidmann T. 2003. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nature Genetics*, 35, 1: 41-48
- Dewannieux M., Heidmann T. 2005. Role of poly(A) tail length in Alu retrotransposition. *Genomics*, 86, 3: 378-381

- Dombroski B. A., Mathias S. L., Nanthakumar E., Scott A. F., Kazazian H. H., Jr. 1991. Isolation of an active human transposable element. *Science*, 254, 5039: 1805-1808
- Doucet A. J., Hulme A. E., Sahinovic E., Kulpa D. A., Moldovan J. B., Kopera H. C., Athanikar J. N., Hasnaoui M., Bucheton A., Moran J. V., Gilbert N. 2010. Characterization of LINE-1 ribonucleoprotein particles. *PLoS Genetics*, 6, 10: e1001150 [1-19]
doi:10.1371/journal.pgen.1001150
- Duggal N. K., Fu W., Akey J. M., Emerman M. 2013. Identification and antiviral activity of common polymorphisms in the APOBEC3 locus in human populations. *Virology*, 443, 2: 329–337
- Dunham I., Kundaje A., Aldred S. F., Collins P. J., Davis C. A., Doyle F., Epstein C. B., Frietze S., Harrow J., Kaul R., ... Lochovsky L. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489, 7414: 57-74
- 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. *Current Biology*, 15, 7: 661-666
- Engels W. R. 1996. P elements in Drosophila. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 204: 103-123
- 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, 7024: 430-433
- Esnault C., Maestre J., Heidmann T. 2000. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature Genetics*, 24, 4: 363-367
- Esnault C., Millet J., Schwartz O., Heidmann T. 2006. Dual inhibitory effects of APOBEC family proteins on retrotransposition of mammalian endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Research*, 34, 5: 1522-1531
- Esnault C., Priet S., Ribet D., Heidmann O., Heidmann T. 2008. Restriction by APOBEC3 proteins of endogenous retroviruses with an extracellular life cycle: ex vivo effects and in vivo "traces" on the murine IAPE and human HERV-K elements. *Retrovirology*, 5: 75 [1-11]
doi:10.1186/1742-4690-5-75
- Etard C., Roostalu U., Strahle U. 2010. Lack of Apobec2-related proteins causes a dystrophic muscle phenotype in zebrafish embryos. *Journal of Cell Biology*, 189, 3: 527-539
- Evan G. I., Lewis G. K., Ramsay G., Bishop J. M. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Molecular and Cellular Biology*, 5, 12: 3610-3616
- Eyzaguirre L. M., Charurat M., Redfield R. R., Blattner W. A., Carr J. K., Sajadi M. M. 2013. Elevated hypermutation levels in HIV-1 natural viral suppressors. *Virology*, 443, 2: 306–312
- Faili A., Aoufouchi S., Gueranger Q., Zober C., Leon A., Bertocci B., Weill J. C., Reynaud C. A. 2002. AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line. *Nature Immunology*, 3, 9: 815-821
- Fanning T., Singer M. 1987. The LINE-1 DNA sequences in four mammalian orders predict proteins that conserve homologies to retrovirus proteins. *Nucleic Acids Research*, 15, 5: 2251-2260
- Farese R. V., Jr., Ruland S. L., Flynn L. M., Stokowski R. P., Young S. G. 1995. Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 5: 1774-1778

- Farkash E. A., Kao G. D., Horman S. R., Prak E. T. 2006. Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay. *Nucleic Acids Research*, 34, 4: 1196-1204
- Feng Q., Moran J. V., Kazazian H. H., Jr., Boeke J. D. 1996. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*, 87, 5: 905-916
- Feschotte C. 2008. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nature Reviews. Genetics*, 9, 5: 397-405
- Feschotte C., Jiang N., Wessler S. R. 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature Reviews. Genetics*, 3, 5: 329-341
- Gallois-Montbrun S., Holmes R. K., Swanson C. M., Fernandez-Ocana M., Byers H. L., Ward M. A., Malim M. H. 2008. Comparison of cellular ribonucleoprotein complexes associated with the APOBEC3F and APOBEC3G antiviral proteins. *Journal of Virology*, 82, 11: 5636-5642
- Gallois-Montbrun S., Kramer B., Swanson C. M., Byers H., Lynham S., Ward M., Malim M. H. 2007. Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *Journal of Virology*, 81, 5: 2165-2178
- Gee P., Ando Y., Kitayama H., Yamamoto S. P., Kanemura Y., Ebina H., Kawaguchi Y., Koyanagi Y. 2011. APOBEC1-mediated editing and attenuation of herpes simplex virus 1 DNA indicate that neurons have an antiviral role during herpes simplex encephalitis. *Journal of Virology*, 85, 19: 9726-9736
- Georgiou I., Noutsopoulos D., Dimitriadou E., Markopoulos G., Apergi A., Lazaros L., Vaxevanoglou T., Pantos K., Syrrou M., Tzavaras T. 2009. Retrotransposon RNA expression and evidence for retrotransposition events in human oocytes. *Human Molecular Genetics*, 18, 7: 1221-1228
- Gilbert N., Lutz-Prigge S., Moran J. V. 2002. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*, 110, 3: 315-325
- Girard A., Sachidanandam R., Hannon G. J., Carmell M. A. 2006. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442, 7099: 199-202
- Goila-Gaur R., Khan M. A., Miyagi E., Kao S., Strelbel K. 2007. Targeting APOBEC3A to the viral nucleoprotein complex confers antiviral activity. *Retrovirology*, 4: 61 [1-10]
doi:10.1186/1742-4690-4-61
- Gonzalez M. C., Suspene R., Henry M., Guetard D., Wain-Hobson S., Vartanian J. P. 2009. Human APOBEC1 cytidine deaminase edits HBV DNA. *Retrovirology*, 6: 96 [1-5]
doi:10.1186/1742-4690-6-96
- Goodier J. L., Cheung L. E., Kazazian H. H., Jr. 2012. MOV10 RNA helicase is a potent inhibitor of retrotransposition in cells. *PLoS Genetics*, 8, 10: e1002941 [1-14]
doi: 10.1371/journal.pgen.1002941
- Goodier J. L., Cheung L. E., Kazazian H. H., Jr. 2013. Mapping the LINE1 ORF1 protein interactome reveals associated inhibitors of human retrotransposition. *Nucleic Acids Research*, 41, 15: 7401-7419
- Goodier J. L., Kazazian H. H., Jr. 2008. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell*, 135, 1: 23-35
- Goodier J. L., Ostertag E. M., Du K., Kazazian H. H., Jr. 2001. A novel active L1 retrotransposon subfamily in the mouse. *Genome Research*, 11, 10: 1677-1685
- Goodier J. L., Ostertag E. M., Engleka K. A., Seleme M. C., Kazazian H. H., Jr. 2004. A potential role for the nucleolus in L1 retrotransposition. *Human Molecular Genetics*, 13, 10: 1041-1048

- Goodier J. L., Zhang L., Vetter M. R., Kazazian H. H., Jr. 2007. LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 18: 6469-6483
- Graham F. L., Smiley J., Russell W. C., Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 36, 1: 59-74
- Greenberg J. R. 1979. Ultraviolet light-induced crosslinking of mRNA to proteins. *Nucleic Acids Research*, 6, 2: 715-732
- Guo J. U., Su Y., Zhong C., Ming G. L., Song H. 2011. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145, 3: 423-434
- Han J. S. 2010. Non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons: mechanisms, recent developments, and unanswered questions. *Mobile DNA*, 1, 1: 15 [1-12]
doi:10.1186/1759-8753-1-15
- Han J. S., Boeke J. D. 2004. A highly active synthetic mammalian retrotransposon. *Nature*, 429, 6989: 314-318
- Hancks D. C., Kazazian H. H., Jr. 2012. Active human retrotransposons: variation and disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 22, 3: 191-203
- Harris C. R., Dewan A., Zupnick A., Normart R., Gabriel A., Prives C., Levine A. J., Hoh J. 2009. p53 responsive elements in human retrotransposons. *Oncogene*, 28, 44: 3857-3865
- Harris R. S., Liddament M. T. 2004. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nature Reviews Immunology*, 4, 11: 868-877
- Harris R. S., Petersen-Mahrt S. K., Neuberger M. S. 2002. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Molecular Cell*, 10, 5: 1247-1253
- Havecker E. R., Gao X., Voytas D. F. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology*, 5, 6: 225
- Hellsten U., Harland R. M., Gilchrist M. J., Hendrix D., Jurka J., Kapitonov V., Ovcharenko I., Putnam N. H., Shu S., Taher L., ... Rokhsar D. S. 2010. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science*, 328, 5978: 633-636
- Hohjoh H., Singer M. F. 1996. Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. *EMBO Journal*, 15, 3: 630-639
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 4: 2587-2595
- Holmes S. E., Singer M. F., Swergold G. D. 1992. Studies on p40, the leucine zipper motif-containing protein encoded by the first open reading frame of an active human LINE-1 transposable element. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 28: 19765-19768
- Horn A. V., Klawitter S., Held U., Berger A., Jaguva Vasudevan A. A., Bock A., Hofmann H., Hanschmann K. M., Trosemeier J. H., Flory E., Jabulowsky R. A., Han J. S., Lower J., Lower R., Munk C., Schumann G. G. 2013. Human LINE-1 restriction by APOBEC3C is deaminase independent and mediated by an ORF1p interaction that affects LINE reverse transcriptase activity. *Nucleic Acids Research*, 42, 1: 396-416
doi:10.1093/nar/gkt898

- Huang J., Liang Z., Yang B., Tian H., Ma J., Zhang H. 2007. Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 46: 33632-33640
- Hulme A. E., Bogerd H. P., Cullen B. R., Moran J. V. 2007. Selective inhibition of Alu retrotransposition by APOBEC3G. *Gene*, 390, 1-2: 199-205
- Hultquist J. F., Lengyel J. A., Refsland E. W., LaRue R. S., Lackey L., Brown W. L., Harris R. S. 2011. Human and rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H demonstrate a conserved capacity to restrict Vif-deficient HIV-1. *Journal of Virology*, 85, 21: 11220-11234
- Huthoff H., Autore F., Gallois-Montbrun S., Fraternali F., Malim M. H. 2009. RNA-dependent oligomerization of APOBEC3G is required for restriction of HIV-1. *PLoS Pathogens*, 5, 3: e1000330 [1-11]
doi:10.1371/journal.ppat.1000330
- Hwang D. M., Hwang W. S., Liew C. C. 1994. Single pass sequencing of a unidirectional human fetal heart cDNA library to discover novel genes of the cardiovascular system. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 26, 10: 1329-1333
- Ichiyanagi K., Nakajima R., Kajikawa M., Okada N. 2007. Novel retrotransposon analysis reveals multiple mobility pathways dictated by hosts. *Genome Research*, 17, 1: 33-41
- Ikeda T., Abd El Galil K. H., Tokunaga K., Maeda K., Sata T., Sakaguchi N., Heidmann T., Koito A. 2011. Intrinsic restriction activity by apolipoprotein B mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of autonomous retrotransposons. *Nucleic Acids Research*, 39, 13: 5538-5554
- 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 Research*, 36, 21: 6859-6871
- Imahashi M., Nakashima M., Iwatani Y. 2012. Antiviral Mechanism and Biochemical Basis of the Human APOBEC3 Family. *Frontiers in Microbiology*, 3: 250 [1-7]
doi:10.3389/fmicb.2012.00250
- Iskow R. C., McCabe M. T., Mills R. E., Torene S., Pittard W. S., Neuwald A. F., Van Meir E. G., Vertino P. M., Devine S. E. 2010. Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell*, 141, 7: 1253-1261
- Ito S., Nagaoka H., Shinkura R., Begum N., Muramatsu M., Nakata M., Honjo T. 2004. Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 7: 1975-1980
- 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. *Nucleic Acids Research*, 35, 21: 7096-7108
- 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, 3: 285-296
- Kajikawa M., Okada N. 2002. LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence. *Cell*, 111, 3: 433-444
- Kajikawa M., Sugano T., Sakurai R., Okada N. 2012. Low dependency of retrotransposition on the ORF1 protein of the zebrafish LINE, ZfL2-1. *Gene*, 499, 1: 41-47

- Kale S. P., Moore L., Deininger P. L., Roy-Engel A. M. 2005. Heavy metals stimulate human LINE-1 retrotransposition. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2, 1: 14-23
- Kalendar R., Tanskanen J., Immonen S., Nevo E., Schulman A. H. 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 12: 6603-6607
- Kanellopoulou C., Muljo S. A., Kung A. L., Ganesan S., Drapkin R., Jenuwein T., Livingston D. M., Rajewsky K. 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. Genes and Development, 19, 4: 489-501
- Kano H., Godoy I., Courtney C., Vetter M. R., Gerton G. L., Ostertag E. M., Kazazian H. H., Jr. 2009. L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. Genes and Development, 23, 11: 1303-1312
- Kapitonov V. V., Jurka J. 2001. Rolling-circle transposons in eukaryotes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 15: 8714-8719
- Kapitonov V. V., Tempel S., Jurka J. 2009. Simple and fast classification of non-LTR retrotransposons based on phylogeny of their RT domain protein sequences. Gene, 448, 2: 207-213
- Kazazian H. H., Jr. 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. Science, 303, 5664: 1626-1632
- Kazazian H. H., Jr., Wong C., Youssoufian H., Scott A. F., Phillips D. G., Antonarakis S. E. 1988. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. Nature, 332, 6160: 164-166
- Kersting C., Tidow N., Schmidt H., Liedtke C., Neumann J., Boecker W., van Diest P. J., Brandt B., Buerger H. 2004. Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. Laboratory Investigation, 84, 5: 582-587
- Khazina E., Truffault V., Buttner R., Schmidt S., Coles M., Weichenrieder O. 2011. Trimeric structure and flexibility of the L1ORF1 protein in human L1 retrotransposition. Nature Structural and Molecular Biology, 18, 9: 1006-1014
- Khazina E., Weichenrieder O. 2009. Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106, 3: 731-736
- Kim D. D., Kim T. T., Walsh T., Kobayashi Y., Matise T. C., Buyske S., Gabriel A. 2004. Widespread RNA editing of embedded alu elements in the human transcriptome. Genome Research, 14, 9: 1719-1725
- Kimura M., Takatsuki A., Yamaguchi I. 1994. Blasticidin S deaminase gene from *Aspergillus terreus* (BSD): a new drug resistance gene for transfection of mammalian cells. Biochimica et Biophysica Acta, 1219, 3: 653-659
- 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 Acids Research, 35, 9: 2955-2964
- Kitamura K., Wang Z., Chowdhury S., Simadu M., Koura M., Muramatsu M. 2013. Uracil DNA Glycosylase Counteracts APOBEC3G-Induced Hypermutation of Hepatitis B Viral Genomes: Excision Repair of Covalently Closed Circular DNA. PLoS Pathogens, 9, 5: e1003361 [1-14]
doi: 10.1371/journal.ppat.1003361

- Kitamura S., Ode H., Nakashima M., Imahashi M., Naganawa Y., Kurosawa T., Yokomaku Y., Yamane T., Watanabe N., Suzuki A., Sugiura W., Iwatani Y. 2012. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19, 10: 1005-1010
- Koito A., Ikeda T. 2013. Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. *Frontiers in Microbiology*, 4: 28 [1-9]
doi:10.3389/fmicb.2013.00028
- 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). *Journal of Biological Chemistry*, 278, 10: 8112-8117
- Konig J., Zarnack K., Rot G., Curk T., Kayikci M., Zupan B., Turner D. J., Luscombe N. M., Ule J. 2010. iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17, 7: 909-915
- Koning F. A., Goujon C., Bauby H., Malim M. H. 2011. Target cell-mediated editing of HIV-1 cDNA by APOBEC3 proteins in human macrophages. *Journal of Virology*, 85, 24: 13448-13452
- Koning F. A., Newman E. N., Kim E. Y., Kunstman K. J., Wolinsky S. M., Malim M. H. 2009. Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets. *Journal of Virology*, 83, 18: 9474-9485
- Kordiš D. 2009. Transposable elements in reptilian and avian (sauropsida) genomes. *Cytogenet Genome Research*, 127, 2-4: 94-111
- Kordiš D., Lovšin N., Gubenšek F. 2006. Phylogenomic analysis of the L1 retrotransposons in Deuterostomia. *Systems Biology*, 55, 6: 886-901
- Krzysiak T. C., Jung J., Thompson J., Baker D., Gronenborn A. M. 2012. APOBEC2 is a monomer in solution: implications for APOBEC3G models. *Biochemistry*, 51, 9: 2008-2017
- Kulpa D. A., Moran J. V. 2005. Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for LINE-1 retrotransposition. *Human Molecular Genetics*, 14, 21: 3237-3248
- Lada A. G., Krick C. F., Kozmin S. G., Mayorov V. I., Karpova T. S., Rogozin I. B., Pavlov Y. I. 2011. Mutator effects and mutation signatures of editing deaminases produced in bacteria and yeast. *Biochemistry*, 76, 1: 131-146
- Land A. M., Law E. K., Carpenter M. A., Lackey L., Brown W. L., Harris R. S. 2013. Endogenous APOBEC3A DNA Cytosine Deaminase Is Cytoplasmic and Nongenotoxic. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 24: 17253-17260
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., ... Chen Y. J. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 6822: 860-921
- Landgraf D., Okumus B., Chien P., Baker T. A., Paulsson J. 2012. Segregation of molecules at cell division reveals native protein localization. *Nature Methods*, 9, 5: 480-482
- Landry S., Narvaiza I., Linfesty D. C., Weitzman M. D. 2011. APOBEC3A can activate the DNA damage response and cause cell-cycle arrest. *EMBO Reports*, 12, 5: 444-450
- Langlois M. A., Beale R. C., Conticello S. G., Neuberger M. S. 2005. Mutational comparison of the single-domain APOBEC3C and double-domain APOBEC3F/G anti-retroviral cytidine deaminases provides insight into their DNA target site specificities. *Nucleic Acids Research*, 33, 6: 1913-1923

- Leblanc J., Weil J., Beemon K. 2013. Posttranscriptional regulation of retroviral gene expression: primary RNA transcripts play three roles as pre-mRNA, mRNA, and genomic RNA. Wiley Interdiscip Rev RNA, 4, 5: 567-580
- Li M. M., Emerman M. 2011. Polymorphism in human APOBEC3H affects a phenotype dominant for subcellular localization and antiviral activity. Journal of Virology, 85, 16: 8197-8207
- Li X. Y., Guo F., Zhang L., Kleiman L., Cen S. 2007. APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. Journal of Biological Chemistry, 282, 44: 32065-32074
- Liang G., Kitamura K., Wang Z., Liu G., Chowdhury S., Fu W., Koura M., Wakae K., Honjo T., Muramatsu M. 2013. RNA editing of hepatitis B virus transcripts by activation-induced cytidine deaminase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110, 6: 2246-2251
- Liao J. M., Zeng S. X., Zhou X., Lu H. 2012. Global effect of inauhzin on human p53-responsive transcriptome. PLoS ONE, 7, 12: e52172 [1-13]
doi:10.1371/journal.pone.0052172
- 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. Current Biology, 14, 15: 1385-1391
- Lindahl T., Barnes D. E., Yang Y. G., Robins P. 2009. Biochemical properties of mammalian TREX1 and its association with DNA replication and inherited inflammatory disease. Biochemical Society Transactions, 37, 3: 535-538
- Lindič N., Budič M., Petan T., Knisbacher A. B., Levanon Y. E., Lovšin N. 2013. Differential inhibition of LINE1 and LINE2 retrotransposition by vertebrate AID/APOBEC proteins. Retrovirology, 10: 156 [1-10]
doi:10.1186/1742-4690-10-156
- Lindner P., Bauer K., Krebber A., Nieba L., Kremmer E., Krebber C., Honegger A., Klinger B., Mocikat R., Pluckthun A. 1997. Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions. Biotechniques, 22, 1: 140-149
- Lindtner S., Felber B. K., Kjems J. 2002. An element in the 3' untranslated region of human LINE-1 retrotransposon mRNA binds NXF1(TAP) and can function as a nuclear export element. RNA, 8, 3: 345-356
- Liu C., Zhang X., Huang F., Yang B., Li J., Liu B., Luo H., Zhang P., Zhang H. 2012. APOBEC3G inhibits microRNA-mediated repression of translation by interfering with the interaction between Argonaute-2 and MOV10. Journal of Biological Chemistry, 287, 35: 29373-29383
- Lovšin N. 2010. Spremljanje retrotranspozicije ob utišanju izražanja proteinov AID/APOBEC v zarodkih rib cebrič (osebni vir, avgust 2010)
- Lovšin N., Gubenšek F., Kordiš D. 2001. Evolutionary dynamics in a novel L2 clade of non-LTR retrotransposons in Deuterostomia. Molecular Biology and Evolution, 18, 12: 2213-2224
- Lovšin N., Peterlin B. M. 2009. APOBEC3 proteins inhibit LINE-1 retrotransposition in the absence of ORF1p binding. Annals of the New York Academy of Sciences, 1178, 268-275
- Luan D. D., Korman M. H., Jakubczak J. L., Eickbush T. H. 1993. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. Cell, 72, 4: 595-605

- 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. *Journal of Virology*, 81, 13: 7238-7248
- 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 Research*, 37, 6: 1854-1867
- Malik H. S., Burke W. D., Eickbush T. H. 1999. The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 6: 793-805
- Malik H. S., Eickbush T. H. 1998. The RTE class of non-LTR retrotransposons is widely distributed in animals and is the origin of many SINEs. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 9: 1123-1134
- Malim M. H. 2009. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364, 1517: 675-687
- Malone C. D., Hannon G. J. 2009. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell*, 136, 4: 656-668
- Martens J. H., O'Sullivan R. J., Braunschweig U., Opravil S., Radolf M., Steinlein P., Jenuwein T. 2005. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO Journal*, 24, 4: 800-812
- Martin S. L., Branciforte D., Keller D., Bain D. L. 2003. Trimeric structure for an essential protein in L1 retrotransposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 24: 13815-13820
- Martin S. L., Cruceanu M., Branciforte D., Wai-Lun Li P., Kwok S. C., Hodges R. S., Williams M. C. 2005a. LINE-1 retrotransposition requires the nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein. *Journal of Molecular Biology*, 348, 3: 549-561
- Martin S. L., Li W. L., Furano A. V., Boissinot S. 2005b. The structures of mouse and human L1 elements reflect their insertion mechanism. *Cytogenet Genome Research*, 110, 1-4: 223-228
- Mathias S. L., Scott A. F., Kazazian H. H., Jr., Boeke J. D., Gabriel A. 1991. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science*, 254, 5039: 1808-1810
- Matlik K., Redik K., Speek M. 2006. L1 antisense promoter drives tissue-specific transcription of human genes. *Journal of Biomedical Biotechnology*, 1: 71753 [1-16]
doi:10.1155/JBB/2006/71753
- Mbisa J. L., Barr R., Thomas J. A., Vandegraaff N., Dorweiler I. J., Svarovskaia E. S., Brown W. L., Mansky L. M., Gorelick R. J., Harris R. S., Engelman A., Pathak V. K. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *Journal of Virology*, 81, 13: 7099-7110
- Mbisa J. L., Bu W., Pathak V. K. 2010. APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms. *Journal of Virology*, 84, 10: 5250-5259
- McCarthy E. M., McDonald J. F. 2004. Long terminal repeat retrotransposons of *Mus musculus*. *Genome Biology*, 5, 3: R14 [1-8]
- Miki Y., Nishisho I., Horii A., Miyoshi Y., Utsunomiya J., Kinzler K. W., Vogelstein B., Nakamura Y. 1992. Disruption of the APC gene by a retrotransposonal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Research*, 52, 3: 643-645
- Moran J. V., DeBerardinis R. J., Kazazian H. H., Jr. 1999. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science*, 283, 5407: 1530-1534

- 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, 5: 917-927
- Morgan H. D., Dean W., Coker H. A., Reik W., Petersen-Mahrt S. K. 2004. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 50: 52353-52360
- Morse B., Rotherg P. G., South V. J., Spandorfer J. M., Astrin S. M. 1988. Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nature*, 333, 6168: 87-90
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 31: 22161-22172
- Munoz-Lopez M., Garcia-Perez J. L. 2010. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Current Genomics*, 11, 2: 115-128
- Muramatsu M., Sankaranand V. S., Anant S., Sugai M., Kinoshita K., Davidson N. O., Honjo T. 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 26: 18470-18476
- Nabel C. S., Jia H., Ye Y., Shen L., Goldschmidt H. L., Stivers J. T., Zhang Y., Kohli R. M. 2012. AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nature Chemical Biology*, 8, 9: 751-758
- Nakamura M., Okada N., Kajikawa M. 2012. Self-interaction, nucleic acid binding, and nucleic acid chaperone activities are unexpectedly retained in the unique ORF1p of zebrafish LINE. *Molecular and Cellular Biology*, 32, 2: 458-469
- Narvaiza I., Linfesty D. C., Greener B. N., Hakata Y., Pintel D. J., Logue E., Landau N. R., Weitzman M. D. 2009. Deaminase-independent inhibition of parvoviruses by the APOBEC3A cytidine deaminase. *PLoS Pathogens*, 5, 5: e1000439 [1-14]
doi:10.1371/journal.ppat.1000439
- Navaratnam N., Morrison J. R., Bhattacharya S., Patel D., Funahashi T., Giannoni F., Teng B. B., Davidson N. O., Scott J. 1993. The p27 catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme is a cytidine deaminase. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 28: 20709-20712
- Nelson V. R., Heaney J. D., Tesar P. J., Davidson N. O., Nadeau J. H. 2012. Transgenerational epigenetic effects of the Apobec1 cytidine deaminase deficiency on testicular germ cell tumor susceptibility and embryonic viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 41: 2766-2773
- Newman E. N., Holmes R. K., Craig H. M., Klein K. C., Lingappa J. R., Malim M. H., Sheehy A. M. 2005. Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Current Biology*, 15, 2: 166-170
- Niewiadomska A. M., Tian C., Tan L., Wang T., Sarkis P. T., Yu X. F. 2007. Differential inhibition of long interspersed element 1 by APOBEC3 does not correlate with high-molecular-mass-complex formation or P-body association. *Journal of Virology*, 81, 17: 9577-9583
- Niranjanakumari S., Lasda E., Brazas R., Garcia-Blanco M. A. 2002. Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions in vivo. *Methods*, 26, 2: 182-190

- Novick P. A., Basta H., Floumanhaft M., McClure M. A., Boissinot S. 2009. The evolutionary dynamics of autonomous non-LTR retrotransposons in the lizard *Anolis carolinensis* shows more similarity to fish than mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 26, 8: 1811-1822
- Obbard D. J., Gordon K. H., Buck A. H., Jiggins F. M. 2009. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364, 1513: 99-115
- OhAinle M., Kerns J. A., Li M. M., Malik H. S., Emerman M. 2008. Antiretroelement activity of APOBEC3H was lost twice in recent human evolution. *Cell Host and Microbe*, 4, 3: 249-259
- OhAinle M., Kerns J. A., Malik H. S., Emerman M. 2006. Adaptive evolution and antiviral activity of the conserved mammalian cytidine deaminase APOBEC3H. *Journal of Virology*, 80, 8: 3853-3862
- Okada N., Hamada M., Ogiwara I., Ohshima K. 1997. SINEs and LINEs share common 3' sequences: a review. *Gene*, 205, 1-2: 229-243
- Okeoma C. M., Lovšin N., Peterlin B. M., Ross S. R. 2007. APOBEC3 inhibits mouse mammary tumour virus replication in vivo. *Nature*, 445, 7130: 927-930
- Okudaira N., Goto M., Yanobu-Takanashi R., Tamura M., An A., Abe Y., Kano S., Hagiwara S., Ishizaka Y., Okamura T. 2011. Involvement of retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 in skin tumorigenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Science*, 102, 11: 2000-2006
- Okudaira N., Okamura T., Tamura M., Iijima K., Goto M., Matsunaga A., Ochiai M., Nakagama H., Kano S., Fujii-Kuriyama Y., Ishizaka Y. 2012. Long interspersed element-1 is differentially regulated by food-borne carcinogens via the aryl hydrocarbon receptor. *Oncogene*, 32, 41: 4903-4912
- Okuyama S., Marusawa H., Matsumoto T., Ueda Y., Matsumoto Y., Endo Y., Takai A., Chiba T. 2012. Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. *International Journal of Cancer*, 130, 6: 1294-1301
- Ooms M., Krikoni A., Kress A. K., Simon V., Munk C. 2012. APOBEC3A, APOBEC3B, and APOBEC3H haplotype 2 restrict human T-lymphotropic virus type 1. *Journal of Virology*, 86, 11: 6097-6108
- Ostertag E. M., Kazazian H. H., Jr. 2001. Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Research*, 11, 12: 2059-2065
- Ovchinnikov I., Troxel A. B., Swergold G. D. 2001. Genomic characterization of recent human LINE-1 insertions: evidence supporting random insertion. *Genome Research*, 11, 12: 2050-2058
- Pak V., Heidecker G., Pathak V. K., Derse D. 2011. The role of amino-terminal sequences in cellular localization and antiviral activity of APOBEC3B. *Journal of Virology*, 85, 17: 8538-8547
- Pauklin S., Sernandez I. V., Bachmann G., Ramiro A. R., Petersen-Mahrt S. K. 2009. Estrogen directly activates AID transcription and function. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 1: 99-111
- pcDNA6.2/myc-His. 2010. Carlsbad California, Invitrogen, Life technologies corporation.
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pcdna6mychis_map.pdf (november, 2013)
- Petersen-Mahrt S. K., Harris R. S., Neuberger M. S. 2002. AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature*, 418, 6893: 99-103
- Petit V., Guetard D., Renard M., Keriel A., Sitbon M., Wain-Hobson S., Vartanian J. P. 2009. Murine APOBEC1 is a powerful mutator of retroviral and cellular RNA in vitro and in vivo. *Journal of Molecular Biology*, 385, 1: 65-78

- Piškurek O., Nishihara H., Okada N. 2009. The evolution of two partner LINE/SINE families and a full-length chromodomain-containing Ty3/Gypsy LTR element in the first reptilian genome of *Anolis carolinensis*. *Gene*, 441, 1-2: 111-118
- Pittoggi C., Sciamanna I., Mattei E., Beraldi R., Lobascio A. M., Mai A., Quaglia M. G., Lorenzini R., Spadafora C. 2003. Role of endogenous reverse transcriptase in murine early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 66, 3: 225-236
- Powell C., Elsaedi F., Goldman D. 2012. Injury-dependent Muller glia and ganglion cell reprogramming during tissue regeneration requires Apobec2a and Apobec2b. *Journal of Neuroscience*, 32, 3: 1096-1109
- Pritham E. J., Putliwala T., Feschotte C. 2007. Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene*, 390, 1-2: 3-17
- 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, 7126: 447-451
- Rai K., Huggins I. J., James S. R., Karpf A. R., Jones D. A., Cairns B. R. 2008. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell*, 135, 7: 1201-1212
- Raiz J., Damert A., Chira S., Held U., Klawitter S., Hamdorf M., Lower J., Stratling W. H., Lower R., Schumann G. G. 2012. The non-autonomous retrotransposon SVA is trans-mobilized by the human LINE-1 protein machinery. *Nucleic Acids Research*, 40, 4: 1666-1683
- Refsland E. W., Stenglein M. D., Shindo K., Albin J. S., Brown W. L., Harris R. S. 2010. Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Research*, 38, 13: 4274-4284
- Reisman D., Sugden B. 1986. trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. *Molecular and Cellular Biology*, 6, 11: 3838-3846
- Robins H., Press W. H. 2005. Human microRNAs target a functionally distinct population of genes with AT-rich 3' UTRs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 43: 15557-15562
- 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, 9: 1281-1285
- Rose P. P., Korber B. T. 2000. Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G --> A hypermutation. *Bioinformatics*, 16, 4: 400-401
- Rosenberg B. R., Hamilton C. E., Mwangi M. M., Dewell S., Papavasiliou F. N. 2011. Transcriptome-wide sequencing reveals numerous APOBEC1 mRNA-editing targets in transcript 3' UTRs. *Nature Structural and Molecular Biology*, 18, 2: 230-236
- Sambrook J. F., Russell D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2100 str.
- Sato Y., Probst H. C., Tatsumi R., Ikeuchi Y., Neuberger M. S., Rada C. 2010. Deficiency in APOBEC2 leads to a shift in muscle fiber type, diminished body mass, and myopathy. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 10: 7111-7118
- Sawyer S. L., Emerman M., Malik H. S. 2004. Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G. *PLoS Biology*, 2, 9: E275 [1-8]
doi: 10.1371/journal.pbio.0020275

- Scherer W. F., Syverton J. T., Gey G. O. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *Journal of Experimental Medicine*, 97, 5: 695-710
- Schumacher A. J., Nissley D. V., Harris R. S. 2005. APOBEC3G hypermutates genomic DNA and inhibits Ty1 retrotransposition in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 28: 9854-9859
- Severi F., Chicca A., Conticello S. G. 2011. Analysis of reptilian APOBEC1 suggests that RNA editing may not be its ancestral function. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 3: 1125-1129
- Shandilya S. M., Nalam M. N., Nalivaika E. A., Gross P. J., Valesano J. C., Shindo K., Li M., Munson M., Royer W. E., Harjes E., Kono T., Matsuo H., Harris R. S., Somasundaran M., Schiffer C. A. 2010. Crystal structure of the APOBEC3G catalytic domain reveals potential oligomerization interfaces. *Structure*, 18, 1: 28-38
- 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, 6898: 646-650
- Shinohara M., Io K., Shindo K., Matsui M., Sakamoto T., Tada K., Kobayashi M., Kadowaki N., Takaori-Kondo A. 2012. APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. *Scientific Reports*, 2: 806 [1-9]
doi: 10.1038/srep00806
- Slotkin R. K., Martienssen R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews. Genetics*, 8, 4: 272-285
- Sodergren E., Weinstock G. M., Davidson E. H., Cameron R. A., Gibbs R. A., Angerer R. C., Angerer L. M., Arnone M. I., Burgess D. R., Burke R. D., ... Wright R. 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 314, 5801: 941-952
- 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 Research*, 33, 3: 846-856
- Speek M. 2001. Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 6: 1973-1985
- Stauch B., Hofmann H., Perkovic M., Weisel M., Kopietz F., Cichutek K., Munk C., Schneider G. 2009. Model structure of APOBEC3C reveals a binding pocket modulating ribonucleic acid interaction required for encapsidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 29: 12079-12084
- Stenglein M. D., Burns M. B., Li M., Lengyel J., Harris R. S. 2010. APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17, 2: 222-229
- Stenglein M. D., Harris R. S. 2006. APOBEC3B and APOBEC3F inhibit L1 retrotransposition by a DNA deamination-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 25: 16837-16841
- Stetson D. B., Ko J. S., Heidmann T., Medzhitov R. 2008. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell*, 134, 4: 587-598
- Stribinskis V., Ramos K. S. 2006. Activation of human long interspersed nuclear element 1 retrotransposition by benzo(a)pyrene, an ubiquitous environmental carcinogen. *Cancer Research*, 66, 5: 2616-2620

- Sugano T., Kajikawa M., Okada N. 2006. Isolation and characterization of retrotransposition-competent LINEs from zebrafish. *Gene*, 365: 74-82
- Suspene R., Aynaud M. M., Guetard D., Henry M., Eckhoff G., Marchio A., Pineau P., Dejean A., Vartanian J. P., Wain-Hobson S. 2011a. Somatic hypermutation of human mitochondrial and nuclear DNA by APOBEC3 cytidine deaminases, a pathway for DNA catabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 12: 4858-4863
- Suspene R., Aynaud M. M., Koch S., Pasdeloup D., Labetoulle M., Gaertner B., Vartanian J. P., Meyerhans A., Wain-Hobson S. 2011b. Genetic editing of herpes simplex virus 1 and Epstein-Barr herpesvirus genomes by human APOBEC3 cytidine deaminases in culture and in vivo. *Journal of Virology*, 85, 15: 7594-7602
- Suspene R., Aynaud M. M., Vartanian J. P., Wain-Hobson S. 2013. Efficient Deamination of 5-Methylcytidine and 5-Substituted Cytidine Residues in DNA by Human APOBEC3A Cytidine Deaminase. *PLoS ONE*, 8, 6: e63461 [1-6]
doi:10.1371/journal.pone.0063461
- Suspene R., Guetard D., Henry M., Sommer P., Wain-Hobson S., Vartanian J. P. 2005. Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 23: 8321-8326
- Suzuki J., Yamaguchi K., Kajikawa M., Ichiyangai K., Adachi N., Koyama H., Takeda S., Okada N. 2009. Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. *PLoS Genetics*, 5, 4: e1000461 [1-10]
doi:10.1371/journal.pgen.1000461
- Swergold G. D. 1990. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 12: 6718-6729
- Symer D. E., Connelly C., Szak S. T., Caputo E. M., Cost G. J., Parmigiani G., Boeke J. D. 2002. Human l1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell*, 110, 3: 327-338
- Szak S. T., Pickeral O. K., Makalowski W., Boguski M. S., Landsman D., Boeke J. D. 2002. Molecular archeology of L1 insertions in the human genome. *Genome Biology*, 3, 10: research0052 [1-18]
- Tan L., Sarkis P. T., Wang T., Tian C., Yu X. F. 2009. Sole copy of Z2-type human cytidine deaminase APOBEC3H has inhibitory activity against retrotransposons and HIV-1. *FASEB Journal*, 23, 1: 279-287
- Taylor B. J., Nik-Zainal S., Wu Y. L., Stebbings L. A., Raine K., Campbell P. J., Rada C., Stratton M. R., Neuberger M. S. 2013. DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis. *eLife*, 2: e00534 [1-14]
doi:10.7554/eLife.00534
- Tchenio T., Casella J. F., Heidmann T. 2000. Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposons. *Nucleic Acids Research*, 28, 2: 411-415
- Teng B., Burant C. F., Davidson N. O. 1993. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science*, 260, 5115: 1816-1819
- Ting D. T., Lipson D., Paul S., Brannigan B. W., Akhavanfar S., Coffman E. J., Contino G., Deshpande V., Iafrate A. J., Letovsky S., Rivera M. N., Bardeesy N., Maheswaran S., Haber D. A. 2011. Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science*, 331, 6017: 593-596

- Ule J., Jensen K., Mele A., Darnell R. B. 2005. CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods*, 37, 4: 376-386
- Ule J., Jensen K. B., Ruggiu M., Mele A., Ule A., Darnell R. B. 2003. CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science*, 302, 5648: 1212-1215
- Vagin V. V., Sigova A., Li C., Seitz H., Gvozdev V., Zamore P. D. 2006. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, 313, 5785: 320-324
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7: RESEARCH0034 [1-12]
- Vartanian J. P., Guetard D., Henry M., Wain-Hobson S. 2008. Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions. *Science*, 320, 5873: 230-233
- Vartanian J. P., Henry M., Marchio A., Suspene R., Aynaud M. M., Guetard D., Cervantes-Gonzalez M., Battiston C., Mazzaferro V., Pineau P., Dejean A., Wain-Hobson S. 2010. Massive APOBEC3 editing of hepatitis B viral DNA in cirrhosis. *PLoS Pathogens*, 6, 5: e1000928 [1-9]
doi:10.1371/journal.ppat.1000928
- Vitte C., Panaud O. 2005. LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model. *Cytogenet Genome Research*, 110, 1-4: 91-107
- Vitullo P., Sciamanna I., Baiocchi M., Sinibaldi-Vallebona P., Spadafora C. 2012. LINE-1 retrotransposon copies are amplified during murine early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 79, 2: 118-127
- Volff J. N., Bouneau L., Ozouf-Costaz C., Fischer C. 2003. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in Genetics*, 19, 12: 674-678
- Vonica A., Rosa A., Arduini B. L., Brivanlou A. H. 2011. APOBEC2, a selective inhibitor of TGF β signaling, regulates left-right axis specification during early embryogenesis. *Developmental Biology*, 350, 1: 13-23
- Zhang H., Yang B., Pomerantz R. J., Zhang C., Arunachalam S. C., Gao L. 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*, 424, 6944: 94-98
- 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. *Journal of Virology*, 78, 11: 6073-6076
- Zheng Y. H., Jeang K. T., Tokunaga K. 2012. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology*, 9: 112 [1-28]
doi:10.1186/1742-4690-9-112
- Wang M., Rada C., Neuberger M. S. 2011. A high-throughput assay for DNA deaminases. *Methods in Molecular Biology*, 718, 171-184
- Wang T., Tian C., Zhang W., Luo K., Sarkis P. T., Yu L., Liu B., Yu Y., Yu X. F. 2007. 7SL RNA mediates virion packaging of the antiviral cytidine deaminase APOBEC3G. *Journal of Virology*, 81, 23: 13112-13124
- Warren W. C., Hillier L. W., Marshall Graves J. A., Birney E., Ponting C. P., Grutzner F., Belov K., Miller W., Clarke L., ... Wilson R. K. 2008. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature*, 453, 7192: 175-183

- Watanabe T., Takeda A., Tsukiyama T., Mise K., Okuno T., Sasaki H., Minami N., Imai H. 2006. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes and Development*, 20, 13: 1732-1743
- Waterston R. H., Lindblad-Toh K., Birney E., Rogers J., Abril J. F., Agarwal P., Agarwala R., Ainscough R., Alexandersson M., An P., ... Lander E. S. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420, 6915: 520-562
- Wei W., Gilbert N., Ooi S. L., Lawler J. F., Ostertag E. M., Kazazian H. H., Boeke J. D., Moran J. V. 2001. Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 4: 1429-1439
- Wichroski M. J., Robb G. B., Rana T. M. 2006. Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathogens*, 2, 5: e41 [1-10]
doi: 10.1371/journal.ppat.0020041
- Wijesinghe P., Bhagwat A. S. 2012. Efficient deamination of 5-methylcytosines in DNA by human APOBEC3A, but not by AID or APOBEC3G. *Nucleic Acids Research*, 40, 18: 9206-9217
- Wissing S., Montano M., Garcia-Perez J. L., Moran J. V., Greene W. C. 2011. Endogenous APOBEC3B restricts LINE-1 retrotransposition in transformed cells and human embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 42: 36427-36437
- Xiong Y., Eickbush T. H. 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO Journal*, 9, 10: 3353-3362
- Yang B., Chen K., Zhang C., Huang S., Zhang H. 2007. Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/apyrimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 16: 11667-11675
- Yang N., Kazazian H. H., Jr. 2006. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13, 9: 763-771
- Yang N., Zhang L., Zhang Y., Kazazian H. H., Jr. 2003. An important role for RUNX3 in human L1 transcription and retrotransposition. *Nucleic Acids Research*, 31, 16: 4929-4940
- Yoder J. A., Walsh C. P., Bestor T. H. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics*, 13, 8: 335-340
- Yu Q., Chen D., Konig R., Mariani R., Unutmaz D., Landau N. R. 2004a. APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 51: 53379-53386
- Yu Q., Konig R., Pillai S., Chiles K., Kearney M., Palmer S., Richman D., Coffin J. M., Landau N. R. 2004b. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11, 5: 435-442

ZAHVALA

Na prvem mestu se iskreno zahvaljujem svoji delovni mentorici dr. Niki Lovšin, ker me je vpeljala v izredno zanimivo in raznoliko področje družine proteinov AID/APOBEC, me okužila s svojim raziskovalnim entuziazmom, ker je z mano delila svoje znanje, mi nudila strokovno pomoč, številne nasvete, moralno podporo, bila z mano potrežljiva in ker mi je neizmerno zaupala. Hvala ji tudi za pregled doktorskega dela.

Iskreno se zahvaljujem tudi svojemu univerzitetnemu mentorju izr. prof. dr. Marku Dolinarju za skrben in učinkovit pregled doktorske disertacije ter za njegovo nalezljivo dobro voljo in prijaznost. Prav tako se zahvaljujem doc. dr. Gregorju Gunčarju, ki me je vzel pod okrilje in mi bil pripravljen pomagati v vsakem trenutku.

Članoma komisije prof. dr. Simonu Horvatu in prof. dr. Radovanu Komelu se iskreno zahvaljujem za prijaznost in natančen, strokoven in hiter pregled doktorskega dela.

Dr. Maruški Budič in raziskovalcem iz univerze Bar-Ilan se zahvaljujem za uspešno raziskovalno sodelovanje.

Prof. dr. Igorju Križaju se zahvaljujem, da mi je omogočil del raziskovalnega dela opravljati na Odseku za biokemijo in molekularno biologijo Instituta Jožef Stefan v Ljubljani, prav vsem bivšim sodelavcем iz odseka B2 pa za prijaznost, nasvete pri delu, moralno podporo, pomoč in za prijateljstvo, nenadomestljive kavice in čudovit uvod v svet raziskovanja.

Zahvaljujem se tudi predstojnici prof. dr. Brigit Lenarčič in vsem sodelavcем iz Katedre za biokemijo, Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, ki so mi s svojim znanjem in izkušnjami pomagali pri delu, ter z mano delili svoj neusahljiv pogum in dobro voljo. Za nesebično pomoč, nasvete, številne konstruktivne diskusije in vsestransko podporo in razumevanje se še posebej zahvaljujem dr. Veri Župunski.

Iz vsega srca hvala mojemu bratu Andreju, mojim dragim gverilkam, najljubši Mausli in vsem mojim najbližjim, ki so mi stali ob strani, me vzpodbjali in verjeli vame. Še posebej sem hvaležna mojemu dragemu Toniju, ker me je podpiral na vse mogoče načine na vseh mogočih področjih, in ker je znal velike probleme spremeniti v papirnate zmaje.

Največja zahvala pa gre moji mami in mojemu očetu, katerima posvečam to delo. Najlepša hvala za najboljši zgled ter za vso podporo, potrežljivost, razumevanje, zaupanje in ljubezen.