

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI  
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE  
ȘCOALA DOCTORALĂ BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**

**Determinanți structurali pentru mobilizarea  
elementelor VNTR-compuse SVA și LAVA**

Teză de doctorat

Rezumat

**Conducator Științific:**

Prof. Dr. Nicolaie DRAGOȘ

**Doctorand:**

Maria-Cornelia-Teodora OCHIȘ  
(CONSTANTINESCU)

Cluj-Napoca

2019



# CUPRINS

MULȚUMIRI.....	3
LISTA ABREVIERILOR .....	4
INDEX FIGURI .....	7
INDEX TABELE .....	8
<b>1. INTRODUCERE</b> .....	<b>9</b>
1.1. Introducere generală .....	9
1.2. Clasificarea elementelor mobile.....	10
1.2.1. Transpozonii ADN .....	11
1.2.2. Transpozonii ARN .....	11
1.2.2.1. Retrotranspozonii autonomi .....	12
1.2.2.2. Retrotranspozonii ne-autonomi .....	15
1.3. Mobilizarea retrotranspozoniilor non-LTR .....	21
1.3.1. Mobilizarea elementului autonom L1 .....	22
1.3.1.1. Transcrierea inversă inițiată la situsul țintă (TPRT) .....	24
1.3.2. Trans-mobilizarea retrotranspozoniilor ne-autonomi.....	26
1.3.2.1. Trans-mobilizarea elementului Alu.....	26
1.3.2.2. Necesități pentru mobilizarea retrotranspozoniilor VNTR-compuși .....	28
1.4. Obiectivele tezei .....	29
<b>2. MATERIALE ȘI METODE</b> .....	<b>30</b>
2.1. Metode generale de biologie moleculară .....	30
2.1.1. Cultivarea și stocarea bacteriilor .....	30
2.1.2. Celule bacteriene competente.....	30
2.1.3. Transformarea celulelor bacteriene .....	30
2.1.4. Izolarea ADN-ului plasmidic .....	31
2.1.5. Manipularea enzimatică a ADN-ului .....	31
2.1.6. Electroforeză în gel de agaroză .....	33
2.1.7. Izolarea din gel de agaroză și purificarea pe coloană.....	33
2.2. Culturi celulare .....	34
2.2.1. Cultivarea celulelor HeLa HA.....	34
2.2.2. Stocarea celulelor HeLa HA .....	34
2.2.3. Determinarea numărului de celule .....	34
2.2.4. Transfecții.....	35
2.3. Construcția plasmidelor (strategie) .....	35
2.3.1. Plasmidul de retrotranspoziție pCEPNeo.....	35
2.3.2. Obținerea elementelor SVA și LAVA .....	36
2.3.3. Generarea himerelor SVA-LAVA cu domenii reciproc schimbate .....	36
2.3.4. Generarea elementelor SVA și LAVA truncate .....	41
2.3.5. Generarea pcDNA3ΔCMV – plasmidul pentru transfecții tranzitorii.....	43
2.3.6. Clonarea SVA și SVAdeltaCT în pcDNA3ΔCMV.....	43
2.4. Testarea potențialului de mobilizare a elementelor wild-type, himerelor cu domenii schimbare și elementelor truncate .....	44
2.4.1. Testul de trans-mobilizare (retrotranspoziție) .....	44
2.5. Influența repetițiilor CT în traficul nucleu-citoplasmatic .....	46
2.5.1. Izolarea ARN.....	46
2.5.2. RT-qPCR.....	48
<b>3. REZULTATE</b> .....	<b>51</b>
3.1. Domeniile elementelor SVA și LAVA sunt incompatibile.....	51
3.1.1. Obținerea himerelor SVA-LAVA cu domenii schimbate .....	51

3.1.2. Testul de retrotranspoziție pentru himerele SVA-LAVA .....	52
3.2. Domeniul CT-hexameric – esențial pentru o mobilizare eficientă .....	54
3.2.1. Obținerea elementelor SVA și LAVA cu deleții 5' .....	54
3.2.2. Testul de retrotranspoziție pentru elementele SVA și LAVA cu deleții 5' .....	55
3.3. Capătul 3' al elementului LAVA are un impact inhibitor în mobilizare .....	57
3.3.1. Obținerea elementelor LAVA cu deleții 3' .....	57
3.3.2. Testul de retrotranspoziție pentru elementele LAVA cu deleții 3' .....	58
3.4. Influența repetițiilor CT în transportul nucleo-citoplasmatic al elementului SVA.....	59
3.4.1 Obținerea plasmidelor pentru transfecție și a ADNc pentru cuantificare .....	59
3.4.2. Evaluarea și validarea qPCR.....	60
3.4.3. Elementele SVA și SVAdeltaCT se acumulează în nucleu .....	60
<b>4. DISCUȚII</b> .....	64
4.1. Similaritatea inserțiilor SVA și LAVA .....	64
4.2. Elementele LAVA au necesități structurale diferite pentru mobilizare .....	67
4.3. Rolul regiunii CT-hexamerice în transportul nucleo-citoplasmatic.....	70
<b>5. CONCLUZII</b> .....	72
REFERINȚE .....	74
ANEXE .....	87
ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ .....	127

## Lista abrevierilor

bp	Perechi de baze
cDNA	ADN complementar
CMV	Citomegalovirus
C <sub>t</sub>	Ciclu prag în qPCR
CT	Regiune bogată în citozină și timină
EN	Endonuclează
<i>env</i>	Gena anvelopei retrovirale
G418	Geneticina sulfat
HERV	Retrovirus endogen uman
Kbp	Kilo perechi de bază
L <sub>E</sub> S	Himera LAVA_E-SVA cu domenii schimbate reciproc
L <sub>F</sub> S	Himera LAVA_F-SVA cu domenii schimbate reciproc
<i>mneol</i>	Caseta raportoare de retrotranspoziție
mRNA	ARN mesager
ORF	Cadru deschis de citire
PGK	Fosfoglicerat kinaza
piwi- RNAs	Supresor al mobilizării transpozozonilor
Pol II /pol III	Polimeraza II și III
PTBP	Proteina de legare a tractului polipirimidinic
RNP	Ribonucleoproteina
RT	Transcriptaza inversă
SINE-R	SINE de origine retrovirală (HERV-K)
SL <sub>E</sub>	Himera SVA-LAVA_E cu domenii schimbate reciproc
SL <sub>F</sub>	Himera SVA-LAVA_F cu domenii schimbate reciproc
SVA2	Element din genomul primatului <i>Macaca mulatta</i>
TPRT	Transcrierea inversă începută la situsul țintă
TSD	Duplicații ale situsului țintă
UTR	Regiune netradusă
VNTR	Număr variabil de repetiții în tandem
ΔCMV	Fară promotor CMV

## Cuvinte cheie

*Nomascus leucogenys*, gibbon, SVA, LAVA, VNTR, retrotranspoziție, repetiții CT-hexamerică.

# 1. INTRODUCERE

## 1.1. Introducere generală

Elementele mobile au fost descoperite pentru prima dată de Barbara McClintock în genomul porumbului (McClintock 1950). La început au fost numite "junk DNA" (Ohno 1972), "gene egoiste" (Dawkins 1976) și "paraziți genomici" (Yoder, Walsh și Bestor 1997), sugerând că nu au o funcție utilă pentru genomul gazdă. Cu toate acestea, studii mai recente au arătat că elementele genetice mobile au un efect benefic pentru genomul gazdă prin crearea de diversitate genetică (Nekrutenko și Li 2001) și influențând fenotipurile (Beck și colab. 2011; Hancks și Kazazian 2012).

Transpozonii ADN și transpozonii ARN sunt principalele tipuri de elemente mobile (Finnegan 1989). Această teză se concentrează asupra transpozoniilor ARN, denumiți și retrotranspozoni, care prin mobilizare se acumulează în genom și influențează compoziția genomică.

SVA (SINE-R-VNTR-Alu, Shen și colab. 1994) și LAVA (LINE1-Alu-VNTR-Alu, Carbone și colab. 2012), împreună cu PVA (PTGR2-VNTR-Alu, Hara și colab. 2012) și FVA (FRAM-VNTR-Alu, Ianc și colab. 2014), fac parte din categoria retrotranspozoniilor VNTR-compuși, specifici primatelor hominoide (Wang și colab. 2005; Carbone și colab. 2012; Hara și colab. 2012; Ianc și colab. 2014; Carbone și colab. 2014). Mobilizarea acestor elemente implică proteinele codificate de elementele L1 (Ostertag și colab. 2003; Hancks și colab. 2011; Raiz și colab. 2012; Carbone și colab. 2014; Ianc și colab. 2014), dar detaliile mecanismului mobilizării lor nu sunt elucidate până în prezent.

În această teză de doctorat au fost investigate necesitățile structurale pentru mobilizare a elementelor VNTR-compuse, existând un interes deosebit pentru acele caracteristici structurale și de secvență ale elementelor SVA și LAVA, care le permit să fie mobilizate în mod eficient.

## 1.2. Clasificarea și structura generală a elementelor mobile

Pe baza procesului lor de mobilizare, elementele mobile pot fi clasificate în: transpozoni ARN (clasa I) și transpozoni ADN (clasa II) (Finnegan 1989).

Transpozonii ADN sunt mobilizați printr-un intermediar ADN prin mecanismul "cut-and-paste", numit și transpoziție. Transpozoniile sunt flancați de repetiții inversate și codifică o transpozază care ajută elementul la auto-excizie (Smit și Riggs 1996) și la inserția într-o altă locație genomică, după scindarea situsului țintă de inserție.

Transpozoni ARN (sau retrotranspozoni) sunt mobilizați prin mecanismul „copy-and-paste“, printr-un ARN intermediar (Cordaux și Batzer 2009). Mecanismul lor de mobilizare implică mai multe etape: transcrierea elementului (și traducerea în cazul retrotranspozoniilor autonomi), transcrierea inversă în ADNc și integrarea ulterioară a copiei ADNc într-o nouă locație genomică după scindarea situsului genomic țintă. Astfel, la sfârșitul acestui proces un transpozon ARN activ este multiplicat în genom. Ca o marcă a mobilizării lor, ei sunt flancați de TSD-uri și se termină cu o coadă poli-A, de asemenea retrotranspozoniile pot fi truncați sau inversați și pot transduce secvențe genomice în timpul procesului de retrotranspoziție (Ostertag și colab. 2003). Retrotranspozoniile pot fi clasificate în continuare în: autonomi, care codifică factorii necesari pentru propria mobilizare, și ne-autonomi, care utilizează în mobilizare proteinele elementelor autonome (Ostertag și Kazazian Jr 2001).

### **1.2.1. Elementul autonom LINE**

Elementele LINE (“Long INterspersed Elements” sau elemente lungi dispersate) sunt singurele elemente autonome active din genomul uman, cuprinzând ~ 21% din genom (Lander și colab. 2001).

Un element de lungime completă (de aproximativ 6 kb în lungime) are o regiune 5’UTR care conține un promotor endogen pentru ARN polimeraza II (Swergold 1990), două cadre deschise de citire (ORF) separate de o secvență „spacer” și o regiune 3’ UTR care conține semnalul de poliadenilare (Dombroski și colab. 1991). ORF1 codifică o proteină de legare a acidului nucleic (Hohjoh și Singer 1996) care are și activitate chaperonică (Martin și Bushman 2001). ORF2 codifică proteina ORF2p cu activitate de endonuclează și de transcriptază inversă (Feng și colab. 1996; Mathias și colab. 1991).

### **1.2.2. Retrotranspozoni ne-autonomi**

Retrotranspozoniile ne-autonomi nu codifică proteine și mobilizarea lor este posibilă numai cu proteinele codificate de elementele autonome. Elementele SINE, elementele VNTR-compuse, dar și pseudogenele procesate intră în această categorie.

Elementele SINE (Short INterspersed Elements) sunt cea mai răspândită clasă de retrotranspozoni din genomul uman. Elementul Alu, principalul reprezentant din această categorie, este specific primatelor (Shen, Batzer și Deininger 1991). Din punct de vedere structural, elementele Alu sunt compuse din două monomere, unul stâng și unul drept, care își au originea în ARN-ul 7SL (Ullu și Tschudi 1984), component al particulei de recunoaștere a semnalului (SRP), iar monomerul stâng conține un promotor intern pentru pol-III (Singer 1982).

Elementele VNTR-compuse, după cum le sugerează și numele, sunt alcătuite din diferite domenii asamblate în jurul regiunii centrale VNTR. Din această categorie fac parte elementele: SVA (Shen și colab. 1994), PVA (Hara și colab. 2012), FVA (Ianc și colab. 2014) și LAVA (Carbone și colab. 2012). Acestea au aceeași structură la capătul 5', dar diferă prin capătul 3'.

### **Elementul SVA**

Elementul SVA are ~ 2 kb și este format la capătul său 5' dintr-o regiune cu repetiții CT-hexametrice (CCCTCT) și o regiune asemănătoare Alu (Alu-like) - care conține două fragmente Alu în orientare antisens și o secvență cu origine necunoscută; urmează o regiune cu număr variabil de 30-50 bp de repetiții în tandem (VNTR) (Zhu și colab. 1992) și o regiune SINE-R (490 pb) la capătul 3', care își are originea în capătul 3' al genei *env* și în partea 3' a regiunii LTR din HERV-K10 (Ono, Kawakami și Takezawa 1987). Elementul se termină printr-un semnal canonic de poliadenilare (AATAAA) și o coadă poli-A (Wang și colab. 2005).

Elementele SVA sunt transcrise de ARN-polimeraza II (Wang și colab. 2005), precum elementele L1 (Swergold 1990), dar promotorul endogen pentru polimeraza II nu a fost identificat până în prezent.

SVA sunt elemente hominoid-specifice, nu au fost identificate elemente SVA la cercopitecide (primatelor „Lumii Vechi”). Urmărind originea SVA în genomul maimuței rhesus, a fost identificat un precursor al regiunii VNTR care este prezent și în elementele SVA. Acest precursor a fost identificat și în genomul uman (Han și colab. 2007) și a fost numit SVA2 (este format dintr-o regiune VNTR, urmată de o regiune unică la capătul 3' și o coadă poli-A). Deci, din punct de vedere evolutiv, se poate spune că elementele SVA își au originea înainte de divergența hominoidelor, dar după divergența cercopitecidelor (Wang și colab. 2005).

Totuși, ele s-au amplificat cu succes numai în hominide (Maimuțele Mari), fiind foarte abundente în genomul uman (~2700) (Wang et al. 2005), al cimpanzeului (~2600), gorilei (~2300) (Levy et al. 2017) și urangutanului (~1800) (Locke et al. 2011), în comparație cu genomul gibbonului care conține doar 29 de copii SVA (Ianc și colab. 2014).

Elementele SVA sunt împărțite în șase mari subfamilii, pe baza mutațiilor de diagnostic față de secvența HERV-K10, numite de la SVA\_A la SVA\_F, de la cele mai vechi din punct de vedere evolutiv la cele mai tinere.

Fiind un element activ, SVA provoacă variații inter-individuale prin polimorfismul prezență/absență (Wang și colab. 2005; Bennett și colab. 2004; Feusier și colab. 2018). De asemenea, se știe că inserțiile SVA influențează contextul genomic, fiind o sursă de diversitate genetică (Damert și colab. 2009; Hancks și colab. 2009; Quinn și Bubb 2014), dar poate produce și boli la om (Kobayashi și colab. 1998; Ostertag și colab. 2003; Callinan și Batzer 2006).



## Elementul LAVA

Elementul LAVA (3' L1/Alu/VNTR/Alu-like 5') a fost descoperit în genomul gibbonului (Carbone și colab. 2012). Precum celelalte elemente VNTR-compuse, LAVA conține o regiune CT-hexamerică, urmată de o secvență Alu-like, un domeniu central VNTR și se termină cu o regiune 3' care provine din intronul 2 al genei codificatoare de HSD17B3 – această porțiune a intronului 2 conține secvențe care provin din AluSz și L1ME5. Iar fragmentul AluSz este flancat de două secvențe unice numite U1 și U2.

Un total de 1797 de copii LAVA au fost identificate în genomul gibbonului, și au fost clasificate în șase familii mari, numite de la LAVA\_A la LAVA\_F (Carbone și colab. 2014). Cea mai veche familie, considerată fosilă, și care deține cea mai lungă regiune Alu-like, LAVA\_A, prezintă o mare asemănare de secvență cu regiunea Alu-like a familiei SVA\_A (Carbone și colab. 2014; Ianc și colab. 2014). Celelalte familii LAVA se aseamănă mai mult între ele din punct de vedere al secvenței și conțin în regiunea Alu-like deleții specifice (precum LAVA\_F) sau inserții (precum LAVA\_D) (Carbone și colab. 2014; Ianc și colab. 2014).

Din punct de vedere evolutiv, elementele LAVA s-au format înainte de scindarea gibbonilor și a maimuțelor mari. Această presupunere se bazează pe faptul că elemente LAVA truncate la capătul 5' – conținând numai partea VNTR și LA - au fost identificate în genomul gorilei, cimpanzeului și în genomul uman (Damert 2018). Nici un astfel de intermediar nu a fost identificat în genomul urangutanului și nici la maimuțele „Lumii Vechi”, iar expansiunea subfamiliilor LAVA ar trebui să fi avut loc după desprinderea gibbonilor și a maimuțelor mari. Numai familia mai tânără, LAVA\_F, pare să fie amplificată după divergența celor patru genuri de gibboni și este specifică doar pentru specia *Nomascus leucogenys* (Carbone și colab. 2014).

## 1.3. Mobilizarea retrotranspozonilor

### 1.3.1. Mobilizarea elementului L1 (mobilizare *cis*)

Ciclul de retrotranspoziție a elementului L1 presupune că elementul genomic L1 este transcris de promotorul său intern și transferat în citoplasmă unde este tradus (McMillan și Singer 1993; Dmitriev și colab. 2007). După traducere, mai multe molecule ORF1p și unele ORF2p împreună cu un ARN-ul L1 și alți factori gazdă, precum PABPC1/4, MOV10, UPF1 și ZCCHC3 (Taylor și colab. 2018), sunt asamblate într-o RNP, în proximitatea ribozomilor. În etapa următoare, complexul de proteine-ARN L1 intră în nucleu în timpul mitozei, când anvelopa nucleară se rupe și rămâne blocat acolo când se formează o nouă anvelopă nucleară (Mita și colab. 2018). În nucleu ARN-ul L1 este transcris invers și integrat într-o nouă locație genomică prin mecanismul TPRT (Luan și colab. 1993), în faza S a ciclului celular.

Mecanismul TPRT începe odată ce catena antisens a situsul genomic de inserție (o secvență bogată în timine) a fost scindată de endonucleaza ORF2p, lăsând liberă o grupare 3'hidroxil. Apoi, coada poli-A a ARN-ului L1 hibridizează la secvența TTTT din locusul genomic țintă, iar domeniul RT al ORF2p folosește capătul 3'OH expus al TTTT-urilor pentru a iniția transcrierea inversă a elementului în ADNc (Luan și colab. 1993). Urmează ca cea de-a doua catenă a situsului țintă să fie scindată pentru a crea un primer pentru sinteza catenei sens. Poziția celei de-a doua scindări față de cea inițială (în aval, în amonte sau în aceeași linie cu prima) va genera duplicarea site-ului țintă (TSD) – și această secvență va flanca elementul inserat.

Celulele au dezvoltat mecanisme pentru a inhiba retrotranspoziția, precum metilarea ADN-ului, modificarea histonelor și „piwi-interacting RNAs”, cu scopul de a menține integritatea genomică (Di'Giacomo și colab. 2013; Yang și Wang 2016). În celulele somatice, mobilizarea L1 este inhibată prin mecanisme epigenetice sau post-transcripționale de către ARN-ul mic de interferență (Garcia-Perez și colab. 2010; Yang și Kazazian 2006).

### **1.3.2. Trans-mobilizarea retrotranspozoniilor ne-autonomi**

Retranspozoniile ne-autonomi, precum Alu și elementele VNTR-compuse, nu codifică proteinele necesare pentru mobilizare și, prin urmare, sunt mobilizați cu ajutorul proteinelor codificate de elementele L1.

Prevalența elementelor Alu în genomul uman, este considerată a fi cauzată de deturnarea mașinăriei L1 - prin mimarea structurii secundare a ARN-urilor asociate cu ribozomii. Astfel, ARN-ul Alu s-ar putea asocia cu ușurință cu ribozomii și va ajunge în proximitatea proteinelor nascente L1 (Dewannieux, Esnault și Heidmann 2003). Alu poate, în acest mod, să recruteze ORF2p în timp ce acesta este tradus. Această interacțiune pare să fie determinantă pentru retrotranspoziția elementelor Alu (Dewannieux, Esnault și Heidmann 2003).

Până în prezent, s-a demonstrat că elemente VNTR-compuse pot fi mobilizate în linii celulare umane, în trans cu ajutorul L1 (Ianc și colab. 2014), și că sunt dependente de L1 ORF1p (Hancks și colab. 2011; Raiz și colab. 2012; Ianc și colab. 2014), dar întregul lor mecanism de mobilizare și factorii gazdă care sunt implicați așteaptă încă să fie descoperiți. Toate studiile au vizat exclusiv elementul SVA. Rolul critic al capătului 5' SVA în mobilizarea eficientă a elementului fost evidențiat prin eliminarea completă a capătului 5' al elementului (și anume repetițiile CT-hexamerice și regiunea Alu-like), ceea ce a condus la o reducere semnificativă a ratei de retrotranspoziție (Raiz și colab. 2012). Acest rezultat a fost confirmat de Hancks și colab (2012), care a concluzionat că partea 5 a elementului SVA\_D reprezintă "un retrotransposon minim SVA activ".

## 1.4. Obiectivele tezei

Elementele VNTR-compuse au o structură similară, dar diferă în ceea ce privește potențialul de mobilizare, așa cum se poate observa din numărul de copii prezente în genomul gibbonului. Dintre elementele VNTR-compuse, elementul SVA a avut o mare expansiune în genomul uman, dar nu și în genomul gibbonului, unde există doar 29 de copii (Ianc și colab. 2014). Pe de altă parte, genomul gibbonului conține multe elementele LAVA, ~ 1700 copii (Ianc și colab. 2014). În ciuda distribuției ample a elementelor SVA și LAVA în genomul uman și, respectiv, al gibbonului, mecanismele moleculare ale propagării lor sunt puțin cunoscute. În plus, diferențele structurale dintre elementele VNTR-compuse nu au fost explorate până în prezent.

Scopul principal al acestei teze a fost de a explora rolurile funcționale ale domeniilor SVA și LAVA în procesul de mobilizare a acestora, având următoarele obiective experimentale:

1. Investigarea domeniilor și a caracteristicilor lor structurale care mediază mobilizarea eficientă a SVA și LAVA. Acest obiectiv s-a realizat prin construirea de himere SVA-LAVA, prin schimbul reciproc de domenii între elementul activ SVA\_E uman și două elemente LAVA (unul activ și unul inactiv, LAVA\_F1 și LAVA\_E), și testarea potențialului lor de retrotranspoziție.
2. Evaluarea rolului regiunii CT-hexamerică în mobilizarea retrotranspononilor VNTR-compuși, SVA și LAVA, prin generarea de elemente mutante cu deleții progresive ale regiunii CT-hexamerică și testarea potențialului lor de mobilizare.
3. Elucidarea rolului capătului 3' al elementului LAVA în retrotranspoziție știind că ~5% din elementele LAVA din genomul gibbonului (*Nomascus leucogenys*) sunt truncate la capătul 3', în aval de regiunea U2. Acest lucru s-a realizat, prin truncarea progresivă a regiunii 3' și testarea acestor structuri truncate în testul de retrotranspoziție.
4. Evaluarea influenței repetițiilor-CT în traficul nucleu-citoplasmatic al elementului SVA, prin cuantificarea nivelelor SVA și SVAdeltaCT (SVA fără regiunea CT-hexamerică) în nucleu și citoplasmă.

## 2. MATERIALE ȘI METODE

### 2.1. Obținerea elementelor SVA și LAVA

Elementul SVA\_E fără situsul lui de poliadenilare a fost obținut de la Annette Damert, clonat pGEM Teasy și pCEPNeo.

Elementele LAVA din genomul gibbonului (*Nomascus leucogenys*) au fost alese din subfamiliile tinere, LAVA\_E și LAVA\_F1. Ele au fost amplificate de către Annette Damert (ADN-ul genomic ne-a fost furnizat de Christian Roos), din locația chr3:108773434 - 108775518 (Nleu3.0) în cazul LAVA\_F și chr2:155391066 - 155392835 (Nleu3.0) în cazul LAVA\_E. Elementele LAVA mi-au fost furnizate clonate fără situsul de poliadenilare în pJET1.2 și pCEPNeo.

### 2.2. Testarea eficienței retrotranspoziției

#### 2.2.1. Generarea himerelor SVA-LAVA cu domenii schimbate reciproc

Prin schimbul reciproc al regiunilor 5' (CT/Alu-like) și 3' (VNTR/SINE-R; VNTR/LA), cu ajutorul enzimelor de restricție între elementele SVA\_E și LAVA\_E/F, s-au generat elemente himere.

Himerele SL<sub>E</sub> și L<sub>E</sub>S conțin domenii de la elementele SVA\_E și LAVA\_E. Situsurile AlwNI/BstAPI ale elementelor SVA\_E și LAVA\_E au fost făcute compatibile prin amplificarea capătului 5' (CT/Alu-like) folosind o amorsă mutagenetică. Capetele 5' obținute de la LAVA\_E și SVA\_E au fost mai apoi combinate cu partea VNTR/SINE-R a SVA\_E și VNTR/LA a elementului LAVA\_E folosind enzimele BstAPI și AlwNI, și inserate în pCEPNeo.

Himerele SL<sub>F</sub> și L<sub>F</sub>S conțin domenii de la elementele SVA\_E și LAVA\_F. Pentru generarea constructului SL<sub>F</sub> schimbul de domenii a fost făcut la capătul 3'. Astfel, regiunea CT/Alu-like/VNTR a elementului SVA\_E a fost amplificată cu o amorsă complementară regiunii 3' VNTR SVA, și care conține și un situs de restricție NcoI (de asemenea prezent în amonte de domeniul LA al elementului LAVA\_F). Fragmentul SVA amplificat e apoi combinat cu domeniul LA al elementului LAVA\_F, în vectorul pCEPNeo via KpnI/NcoI/NheI. În cazul generării constructului L<sub>F</sub>S, a fost amplificat capătul 5' al elementului LAVA\_F cu o amorsă mutagenetică pentru a introduce situsul de restricție SmaI. Fragmentul obținut a fost combinat cu regiunea VNTR/SINE-R a elementului SVA și clonat în pCEPNeo folosind KpnI/(capăt bont)/NheI.

### **2.2.2. Generarea elementelor SVA și LAVA truncate**

Regiunea CT-hexamerică a elementelor SVA și LAVA\_F, dar și domeniul 3'-al elementului LAVA\_F au fost truncate. Scurtarea progresivă a fragmentelor ADN s-a realizat cu nucleaza Bal-31 prin creșterea progresivă a timpului de incubare a reacției. Fragmentele truncate obținute au fost reparate la capete cu ADN polimeraza T4 și apoi ligate în vectorul de destinație dorit: pCEPNeo sau pcDNA3deltaCMV.

### **2.2.3. Testarea potențialului de mobilizare a elementelor wilde-type, constructelor cu domenii schimbate și elementelor cu capete truncate**

#### **2.2.3.1. Transfecții**

4 x 10<sup>5</sup> celule HeLa HA au fost puse în flacoane T25 cu 24 ore înainte de transfecție. Celulele au fost co-transfectate cu 2 μg plasmid de testare și 2 μg pJM101L1RP\_ΔNeo (plasmid donor de protein L1, obținut de la John Moran), folosind reactivul de transfecție X-tremeGENE 9 DNA, conform instrucțiunilor producătorului.

Și vectorul fără insert pCEPNeo a fost testat, ca și control pentru rata de formare a pseudogenelor. Iar elementele wild-type au fost folosite pentru comparație.

#### **2.2.3.2. Testul de retrotranspoziție (trans-mobilizare)**

Potențialul de mobilizare al himerelor SVA/LAVA cu domenii schimbate, dar și al elementelor SVA și LAVA truncate a fost mobilizate în celule HeLa HA prin testul de retrotranspoziție.

Testul de trans-mobilizare a fost efectuat așa cum a fost descris de Moran și colab. 1996 și de Raiz și colab. 2012, cu unele modificări prezentate în teză. Ratele de retrotranspoziție au fost exprimate ca medie a coloniilor rezistente la G418 și raportate la media coloniilor rezistente obținute pentru SVA\_E sau LAVA, care au fost considerate 100%.

### **2.3. Influența repetițiilor CT-hexamerică în traficul nucleo-citoplasmatic.**

#### **2.3.1. Clonarea elementelor SVA și SVAdeltaCT în pcDNA3ΔCMV**

Pentru a investiga dacă regiunea CT-hexamerică are o influență în transportul nucleo-citoplasmatic, elementul SVA\_E cu sau fără regiunea CT-hexamerică (SVAdeltaCT) a fost clonat în plasmidul pcDNA3ΔCMV (de la care promotorul CMV a fost înlăturat). Astfel, elementul SVA va fi exprimat de promotorul său intern.

### **2.3.2. Transfecții tranzitorii**

Transfecțiile au fost realizate pe  $1 \times 10^6$  celule HeLa HA, într-o placă Petri de 10 cm, și folosind 5  $\mu$ g plasmid test și reactivul de transfecție X-tremeGENE 9 DNA, conform instrucțiunilor producătorului.

### **2.3.3. Izolarea ARN-ului și transcrierea inversă**

La 24 de ore după transfecție o placă Petri de 10 cm confluentă a fost împărțită 1:2. După încă 24 de ore, ARN-ul nuclear și cel citoplasmatic a fost izolat. ARN-ul nuclear a fost izolat conform protocolului lui Nevins (Nevins 1987), iar izolarea ARN-ului citoplasmatic s-a bazat pe solubilizarea membrane citoplasmatică cu un tampon de liză hipoton cu NP-40 (Farrell 2005 - protocol). ARN-ul astfel obținut a fost stocat la  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Transcrierea inversă s-a realizat cu kit-ul Verso cDNA Synthesis, conform indicațiilor producătorului.

### **2.3.4. PCR cantitativ (qPCR) și analiza datelor**

Amorse specifice și proba de hibridizare au fost create astfel încât să amplifice și să detecteze doar transcriptul SVA exprimat de pe plasmidul de transfecție, și să se evite astfel amplificarea elementului SVA endogen. Exprimarea elementului SVA a fost cuantificată folosind kit-ul comercial Maxima Probe qPCR Master Mix, iar exprimarea genei de referință PGK a fost cuantificată cu kit-ul Maxima SYBR Green qPCR Master Mix. Secvențele amorselor și detaliile pentru reproducerea reacțiilor se pot găsi în teză.

Pentru analiza datelor s-a folosit ca genă internă de referință PGK. Ct-ul a fost calculat automat folosind Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7. Metoda Livak (Livak și Schmittgen 2001) a fost utilizată pentru cuantificarea relativă a SVA, iar media coeficientului Livak ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) obținut a fost reprezentată graphic.

### 3. REZULTATE

#### 3.1. Domeniile elementelor SVA și LAVA sunt incompatibile

Himerele SVA-LAVA ( $SL_E$ ,  $L_E S$ ,  $SL_F$  și  $L_F S$ ) obținute prin schimbul reciproc de domenii, elementele wild-type SVA\_E, LAVA\_E, LAVA\_F, dar și pCEPNeo (vectorul fără insert) au fost testate pentru abilitatea lor de mobilizare în celule HeLa HA, în experimental de retrotranspoziție.

După cum era de așteptat, elementul wild-type LAVA\_E a avut o rată de mobilizare scăzută, comparativ cu SVA și cu elementul activ LAVA\_F. În comparație cu LAVA\_E (considerat și dovedit inactiv), himera  $SL_E$  a avut o mică creștere a ratei de mobilizare; sugerând că regiunea 5' a elementului SVA element nu a putut amplifica mobilizarea elementului inactiv LAVA\_E. Iar în cazul himerei  $L_E S$  era de așteptat acest rezultat, nu s-a mobilizat peste rata de formare a pseudogenelor, explicația fiind că are capătul 5'CT-Alu-like de la elementul inactiv LAVA\_E.

În ceea ce privește himera  $L_F S$ , care are regiunea 5'CT-Alu-like de la elementul activ LAVA\_F, mobilizarea nu a fost eficientă, nici în cazul  $SL_F$  - amandoua himerele fiind o combinație de două elemente active ar fi fost de așteptat să rezulte elemente himere active. Acest rezultat poate indica că SVA și LAVA au căi de mobilizare care diferă semnificativ.

În ansamblu, aceste rezultate sugerează că domeniile elementelor SVA și LAVA sunt incompatibile și că aceste două familii de retrotranspozoni pot avea căi distincte de mobilizare cu diferite necesități structurale sau de secvență. Aceste date au fost publicate în Ianc și colab. (2014).

#### 3.2. Domeniul CT-hexameric – esențial pentru o mobilizare eficientă

Pentru a testa dacă lungimea regiunii CT-hexamerice poate influența eficiența de mobilizare a elementelor, au fost generate deleții progressive în regiunea CT-hexamerică a elementelor SVA\_E și LAVA\_F și au fost testate pentru capacitatea lor de mobilizare. Au fost obținute 5 elemente SVA truncate și 3 LAVA\_F, care acoperă întreaga regiune CT-hexamerică.

Cum era de așteptat, rezultatele retrotranspoziției au arătat că toate constructele cu deleții au fost mai slab mobilizate decât elementele de lungime completă. În cazul SVA, doar elementul de lungime completă a avut o mobilizare eficientă. Acest rezultat susține existența diferitelor necesități de mobilizare pentru elementele SVA și LAVA.

### **3.3. Capătul 3' al elementului LAVA - un impact inhibitor asupra mobilizării**

Pentru a evalua rolul regiunii 3' a elementului LAVA în retrotranspoziție, s-au obținut deleții progresive în regiunea 3'. Au fost selectate patru elemente reprezentative LAVA\_F cu deleție 3'. Clonele selectate sunt truncate în fiecare regiune a părții 3' LA.

Clonele LAVA truncate au fost testate pentru potențialul lor de mobilizare într-un test de retrotranspoziție. Rezultatele retrotranspoziției arată că toate constructele cu deleții la capătul 3' au fost mai activi decât elementul LAVA\_F de lungime întreagă. Acest lucru sugerează că regiunile U1, AluSz și U2 nu sunt esențiale în procesul de mobilizare. Surprinzător, regiunea L1ME5, absentă în toți mutanții cu deleție 3' și prezentă doar în elementul de lungime întreagă, s-a dovedit că are un efect inhibitor asupra retrotranspoziției. Datele au fost publicate în Ianc și colab. (2014).

### **3.4. Regiunea CT-hexamerică SVA – nu are o influență în transportul nucleo-citoplasmatic**

Se știe puțin despre ruta intracelulară a elementului SVA. Doar un studiu a arătat distribuția subcelulară a ARN-ului SVA, difuz localizat în citoplasmă și în agregate mari în nucleu (Goodier și colab. 2010). Dar mecanismul de export în citoplasmă și reimportul în nucleu a ARN-ului SVA rămâne necunoscut. Studiile anterioare (Hancks și colab. 2012; Raiz și colab. 2012), dar și rezultatele acestei lucrări, au arătat că repetările CT-hexamerică au un rol important în mobilizarea SVA și, respectiv, LAVA. Deci, în continuare am dorit să urmărim domeniul CT-hexameric în transportul nucleo-citoplasmatic. Pentru aceasta, un element SVA de lungime completă și un element SVA 5'-truncat (cu regiunea CT-hexamerică complet îndepărtată) au fost transfectate tranzitoriu în celule HeLa HA, iar nivelul ARN-ului SVA din citoplasmă și nucleu a fost cuantificat pentru a vedea dacă regiunea CT-hexamerică are un rol în exportul și reimportul nuclear.

Rezultatele obținute arată că, în nucleu, atât SVA cât și SVADeltaCT, se găsesc la niveluri mai ridicate decât în citoplasmă. Abundența nucleară detectată pentru SVA și SVADeltaCT confirmă rezultatele unui studiu anterior al lui Goodier și colab. (2010). De asemenea, distribuția celulară a ARN-ului SVA pare să nu fie influențată de lipsa repetărilor CT.

Sunt necesare studii suplimentare pentru a identifica cauza exactă a acestor rezultate. Și, de asemenea, identificarea factorilor celulari care interacționează cu elementele este obligatorie pentru elucidarea căii de mobilizare a SVA.



## 4. DISCUȚII

Pe baza rezultatelor obținute în această teză am putea spune că mobilizarea elementelor LAVA și SVA diferă semnificativ. În această teză s-a arătat că elementul cel mai tânăr din punct de vedere evolutiv, LAVA\_F, este mai bine mobilizat decât LAVA\_E și decât elementul uman SVA\_E. Această diferență în rata de mobilizare a elementelor LAVA\_E și LAVA\_F se poate datora structurii diferite a regiunii Alu-like, elementul foarte activ LAVA\_F1 având o regiune Alu-like mai scurtă, cel mai probabil datorită unui eveniment de splicing, pentru că un situs donor a fost detectat la situsul de trunchare (Ianc și colab. 2014). Diferențe între secvențele Alu-like sunt observabile și la subfamiliile SVA. Elementele SVA mai tinere din punct de vedere evolutiv conțin de asemenea deleții în regiunea Alu-like. În plus, elementele PVA și FVA nu sunt caracterizate de deleții în domeniul Alu-like și au dovedit o rată de retrotranspunere mai mică (Ianc și colab. 2014).

Structura modulară a elementelor SVA și LAVA a permis testarea diferitelor combinații de domenii sau a elementelor de lungime diferită într-un test de mobilizare "*in trans*" pentru a identifica domeniul care le face să fie preferate de proteinele L1. Am demonstrat că regiunea 5' este foarte importantă pentru mobilizarea eficientă a elementelor SVA, dar elementele LAVA au cerințe diferite de mobilizare. Pe baza acestor rezultate, sugerăm existența a două căi de mobilizare pentru elementele VNTR-compuse. "Calea SVA" - în care regiunea 5' este esențială pentru o mobilizare eficientă, pare să fie folosită și de elementele PVA și FVA (Ianc și colab. 2014). Pentru LAVA cheia mobilizării pare să nu fie în capătul 5' ca și în cazul elementelor SVA, PVA și FVA și nici în regiunea 3'. Lupan și colab. (2015) au arătat că regiunea VNTR are un rol cheie în mobilizarea LAVA, iar regiunea CT pare să aibă doar un rol modulator în "calea LAVA" de mobilizare. Existența "căii LAVA" trebuie confirmată și pentru elementele LAVA, din alte subfamilii, și mobilizarea ar trebui testată într-o linie celulară de gibbon, în co-transfecție cu un element L1 din genomul gibbonului.

Regiunea CT-hexamerică seamănă cu motivul TOP - o secvență terminală oligopirimidinică la capătul 5', prezent în ARN-urile mesagere TOP, unde se inițiază transcrierea prin ARN pol II. Se poate specula că rolul observat al tractului CT ar putea fi dat de proteinele cu care acesta ar putea interacționa, cum ar fi proteinele La sau PTBP. Proteina La se leagă la tractul 5' oligopirimidinic al ARN-urilor TOP (Cardinali și colab. 2003) și astfel se poate presupune că proteina La ar putea fi implicată și în retrotranspoziție. De asemenea, și proteina PTBP e implicată în splicing (Keppetipola și colab. 2012) și interacționează cu unele ARN-uri care conțin o secvență de 15-25 pirimidine (Reid și colab. 2009). Această proteină este implicată în exportul de ARNm și s-a dovedit că este un co-factor în exportul nuclear al ARN-

ului virusului hepatitei B (Zang și colab. 2001). Ar fi interesant să se investigheze dacă proteinele La și PTBP interacționează cu ARN-urile elementelor VNTR-compuse.

Deși căile de mobilizare ale LAVA și SVA par să difere în mod semnificativ, aceste elemente împărtășesc unele asemănări în ceea ce privește inserțiile genomice. Dacă se analizează inserțiile LAVA și SVA preexistente în genom, se observă că aproximativ 63,4% din SVA și 48% din elementele LAVA sunt inserții de lungime întreagă (Wang și colab. 2005; Carbone și colab. 2014). O altă similaritate între inserțiile SVA și LAVA este dată de situsul de inserție în genom; nu s-a observat nici o preferință pentru inserția în gene sau în apropierea genelor (Hancks și colab. Hancks și colab. 2012, Raiz și colab. 2012, Ianc și colab. 2014) . În ceea ce privește inserția intragenică a elementelor LAVA, majoritatea inserțiilor preexistente și *de novo* au apărut în introni (Ianc și colab. 2014, Carbone și colab. 2014). Frecvență scăzută a inserțiilor în exoni s-a observat și în cazul copiilor SVA din genomul uman (Hancks și colab. 2009).

## 5. CONCLUZII

Această teză se focusează pe mobilizarea elementelor VNTR-compuse SVA și LAVA, și aduce noi informații despre contribuția domeniilor elementelor în potențialul lor de mobilizare, oferind astfel o mai bună înțelegere a biologiei retrotranspozoniilor VNTR-compuse.

Prin schimbul reciproc de domenii între elementele SVA și LAVA s-au generat elemente himere, cărora le-a fost testat potențialul de mobilizare cu scopul de a obține o primă idee despre necesitățile structurale pentru retrotranspoziția elementelor. Astfel, am aflat că himerele derivate din două elemente foarte active (SVA și elementul mai tânăr LAVA\_F) sunt inactive. Am concluzionat că domeniile SVA și LAVA sunt incompatibile și, cel mai probabil, căile lor de mobilizare diferă semnificativ, acesta fiind primul studiu care sugerează existența a două căi de mobilizare diferite pentru elementele VNTR-compuse.

Acesta este primul studiu care arată importanța repetițiilor CT-hexamerică în mobilizarea elementului LAVA. Am arătat că toate structurile SVA și LAVA cu deleție în regiunea CT au fost mai slab mobilizate decât elementele de lungime întreagă; acest lucru sugerează că domeniul CT-hexameric este esențial pentru mobilizarea eficientă a elementelor VNTR-compuse.

În plus, această teză a demonstrat pentru prima dată care este impactul regiunii 3' al elementelor LAVA asupra retrotranspoziției; toate structurile LAVA cu deleție în regiunea 3' au fost mai bine mobilizate decât elementul LAVA de lungime completă și am ajuns la concluzia că regiunea LIME5 este responsabilă pentru efectul inhibitor asupra retrotranspoziției.

În cele din urmă, am încercat să caracterizăm regiunea CT-hexamerică prin investigarea influenței acestei regiuni în traficul nucleo-citoplasmic al elementului SVA. Rezultatele au arătat că domeniul CT-hexamer s-ar putea să nu aibă o influență semnificativă asupra transportului nuclear al SVA. Dar, atât SVA cât și SVAdeltaCT, au fost găsite într-o cantitate mare în nucleu, confirmând studiile anterioare care au arătat că SVA formează agregate în nucleu (Goodier și colab. 2010).

Identificarea domeniilor structurale care influențează mobilizarea elementelor VNTR-compuse este de un interes deosebit, deoarece poate deschide noi direcții de cercetare, cum ar fi investigarea factorilor gazdă care interacționează cu domeniile 5' și 3' ale elementelor și elucidarea căilor de mobilizare a elementelor SVA și LAVA. Rezultatele obținute în această teză au oferit un punct de pornire pentru studiile ulterioare efectuate de colegii de laborator. Un prim pas pentru elucidarea căii de mobilizare LAVA a fost făcut de colegii mei, Lupan și colab. (2015), pe baza rezultatelor obținute în această teză, investigând rolul regiunii centrale VNTR în mobilizarea elementelor LAVA. De asemenea, colega mea Bianca Ianc, în teza ei de doctorat, a continuat activitatea mea și a identificat factorii celulari care interacționează cu elementele SVA.

## REFERINTE

- Beck CR., Garcia-Perez JL, Badge RM, and Moran JV. 2011. "LINE-1 Elements in Structural Variation and Disease." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 12 (1): 187–215.
- Bennett EA, Coleman LE, Tsui C, Pittard WS, and Devine SE. 2004. "Natural Genetic Variation Caused by Transposable Elements in Humans." *Genetics* 168 (2): 933–51.
- Callinan PA and Batzer MA. 2006. "Retrotransposable Elements and Human Disease." *Genome Dynamics* 1: 104–15.
- Carbone L, Harris RA, Gnerre S, Veeramah KR, Lorente-Galdos B, Huddleston J, Meyer TJ, et al. 2014. "Gibbon Genome and the Fast Karyotype Evolution of Small Apes." *Nature* 513 (7517): 195–201.
- Carbone L, Harris RA, Mootnick AR, Milosavljevic A, Martin DIK, Rocchi M, Capozzi O, et al. 2012. "Centromere Remodeling in Hoolock Leuconedys (Hylobatidae) by a New Transposable Element Unique to the Gibbons." *Genome Biology and Evolution* 4 (7): 648–58.
- Cardinali B, Carissimi C, Gravina P, Pierandrei-Amaldi P. 2003. "La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes." *The Journal of biological chemistry* 278(37): 35145-51.
- Cordaux R and Batzer MA. 2009. "The Impact of Retrotransposons on Human Genome Evolution." *Nature Reviews Genetics* 10 (10): 691–703.
- Damert A. 2018. "Lineage-Specific Evolution of SVA and LAVA Retrotransposons" *Molecular Life* 2 (1): 11–15.
- Damert A, Raiz J, Horn AV, Löwer J, Wang H, Xing J, Batzer MA, Löwer R, Schumann GG. 2009. "5'-Transducing SVA Retrotransposon Groups Spread Efficiently throughout the Human Genome." *Genome Research* 19 (11): 1992–2008.
- Dawkins R. 1976. "The Selfish Gene." Oxford University Press.
- Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T. 2003. "LINE-Mediated Retrotransposition of Marked Alu Sequences." *Nature Genetics* 35 (1): 41–48.
- Di'Giacomo M, Comazzetto S, Saini H, De'Fazio S, Carrieri C, Morgan M, Vasiliauskaite L, Benes V, Enright A, O'Carroll D. 2013. "Multiple Epigenetic Mechanisms and the piRNA Pathway Enforce LINE1 Silencing during Adult Spermatogenesis." *Molecular Cell* 50 (4): 601–8.
- Dmitriev SE, Andreev DE, Terenin IM, Olovnikov IA, Prassolov VS, Merrick WC, Shatsky IN. 2007. "Efficient Translation Initiation Directed by the 900-Nucleotide-Long and GC-Rich 5' Untranslated Region of the Human Retrotransposon LINE-1 mRNA Is Strictly Cap Dependent rather than Internal Ribosome Entry Site Mediated." *Molecular and Cellular Biology* 27 (13): 4685–97.
- Dombroski BA, Mathias SL, Nanthakumar E, Scott AF, Kazazian HH. 1991. "Isolation of an Active Human Transposable Element." *Science* 254 (5039).
- Farrell RE Jr. 2005. "RNA Methodologies: Laboratory Guide for Isolation and Characterization." *Elsevier/Academic Press*. 3th ed.
- Feng Q, Moran JV, Kazazian HH, Boeke JD. 1996. "Human L1 Retrotransposon Encodes a Conserved Endonuclease Required for Retrotransposition." *Cell* 87 (5): 905–16.
- Feusier J, Watkins WS, Thomas J, Farrell A, Witherspoon DJ, Baird L, Ha H, Xing J, Jorde LB. 2018. "Pedigree-Based Estimation of Human Mobile Element Retrotransposition Rates." *bioRxiv*, 506691.
- Finnegan DJ. 1989. "Eukaryotic Transposable Elements and Genome Evolution." *Trends in Genetics* : 5 (4): 103–7.
- Garcia-Perez JL, Morell M, Scheys JO, Kulpa DA, Morell S, Carter CC, Hammer GD, et al. 2010. "Epigenetic Silencing of Engineered L1 Retrotransposition Events in Human Embryonic Carcinoma Cells." *Nature* 466 (7307): 769–73.

- Goodier JL, Mandal PK, Zhang L, Kazazian HH Jr. 2010. “Discrete Subcellular Partitioning of Human Retrotransposon RNAs despite a Common Mechanism of Genome Insertion.” *Human Molecular Genetics* 19 (9): 1712–25.
- Han K, Konkel MK, Xing J, Wang H, Lee j, Meyer TJ, Huang CT, et al. 2007. “Mobile DNA in Old World Monkeys: A Glimpse Through the Rhesus Macaque Genome.” *Science* 316 (5822): 238–40.
- Hancks DC, Ewing AD, Chen JE, Tokunaga K, Kazazian HH Jr. 2009. “Exon-Trapping Mediated by the Human Retrotransposon SVA.” *Genome Research* 19 (11): 1983–91.
- Hancks DC, Goodier JL, Mandal PK, Cheung LE, Kazazian HH Jr. 2011. “Retrotransposition of Marked SVA Elements by Human L1s in Cultured Cells.” *Human Molecular Genetics* 20 (17): 3386–3400.
- Hancks DC and Kazazian HH Jr. 2012. “Active Human Retrotransposons: Variation and Disease.” *Current Opinion in Genetics & Development* 22 (3): 191–203.
- Hancks DC, Mandal PK, Cheung LE, Kazazian HH Jr. 2012. “The Minimal Active Human SVA Retrotransposon Requires Only the 5'-hexamer and Alu-like Domains.” *Molecular and Cellular Biology* 32 (22): 4718–26.
- Hara T, Hirai Y, Baicharoen S, Hayakawa T, Hirai H, Koga A. 2012. “A Novel Composite Retrotransposon Derived from or Generated Independently of the SVA (SINE/VNTR/Alu) Transposon Has Undergone Proliferation in Gibbon Genomes.” *Genes & Genetic Systems* 87 (3): 181–90.
- Hohjoh H and Singer MF. 1996. “Cytoplasmic Ribonucleoprotein Complexes Containing Human LINE-1 Protein and RNA.” *The EMBO Journal* 15 (3): 630–39.
- Ianc B, Ochis C, Persch R, Popescu O, Damert A. 2014. “Hominoid Composite Non-LTR Retrotransposons-Variety, Assembly, Evolution, and Structural Determinants of Mobilization.” *Molecular Biology and Evolution* 31 (11): 2847–64.
- Keppetipola N, Sharma S, Li Q, Black DL. 2012. “Neuronal regulation of pre-mRNA splicing by polypyrimidine tract binding proteins, PTBP1 and PTBP2.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 47(4): 360-378.
- Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, et al. 1998. “An Ancient Retrotransposal Insertion Causes Fukuyama-Type Congenital Muscular Dystrophy.” *Nature* 394 (6691): 388–92.
- Kulpa DA and Moran JV. 2006. “Cis-Preferential LINE-1 Reverse Transcriptase Activity in Ribonucleoprotein Particles.” *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (7): 655–60.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, et al. 2001. “Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome.” *Nature* 409 (6822): 860–921.
- Levy O, Knisbacher BA, Levanon EY, Havlin S. 2017. “Integrating Networks and Comparative Genomics Reveals Retroelement Proliferation Dynamics in Hominid Genomes.” *Science Advances* 3 (10): e1701256.
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method.” *Methods* 25 (4): 402–8.
- Locke DP, Hillier LW, Warren WC, Worley KC, Nazareth LV, Muzny DM, Yang SP, et al. 2011. “Comparative and Demographic Analysis of Orang-Utan Genomes.” *Nature* 469 (7331): 529–33.
- Luan DD, Korman MH, Jakubczak JL, Eickbush TH. 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.
- Lupan I, Bulzu P, Popescu O, Damert A. 2015. “Lineage Specific Evolution of the VNTR Composite Retrotransposon Central Domain and Its Role in Retrotransposition of Gibbon LAVA Elements.” *BMC Genomics* 16 (1): 389.
- Martin SL and Bushman FD. 2001. “Nucleic Acid Chaperone Activity of the ORF1 Protein from the Mouse LINE-1 Retrotransposon.” *Molecular and Cellular Biology* 21 (2): 467–75.

- Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH Jr, Boeke JD, Gabriel A. 1991. "Reverse Transcriptase Encoded by a Human Transposable Element." *Science* 254 (5039): 1808–10.
- McClintock B. 1950. "The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 36 (6):344–55.
- McMillan JP and Singer MF. 1993. "Translation of the Human LINE-1 Element, LIHs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(24): 11533–11537.
- Mita P, Wudzinska A, Sun X, Andrade J, Nayak S, Kahler DJ, Badri S, et al. 2018. "LINE-1 Protein Localization and Functional Dynamics during the Cell Cycle." *eLife* 7: e30058.
- Moran JV, Holmes SE, Naas TP, DeBerardinis RJ, Boeke JD, Kazazian HH Jr, Shibata H, et al. 1996. "High Frequency Retrotransposition in Cultured Mammalian Cells." *Cell* 87 (5): 917–27.
- Nekrutenko A and Li WH. 2001. "Transposable Elements Are Found in a Large Number of Human Protein-Coding Genes." *Trends in Genetics* 17 (11): 619–21.
- Nevins JR. 1987. "[22] Isolation and analysis of nuclear RNA." *Methods in Enzymology* 152: 234–41.
- Ohno S. 1972. "So Much "junk" DNA in Our Genome." *Brookhaven Symposia in Biology* 23:366-70.
- Ostertag EM and Kazazian HH Jr. 2001. "Biology of Mammalian L1 Retrotransposons." *Annual Review of Genetics* 35 (1): 501–38.
- Ostertag EM, Goodier JL, Zhang Y, Kazazian HH Jr. 2003. "SVA Elements Are Nonautonomous Retrotransposons That Cause Disease in Humans." *American Journal of Human Genetics* 73 (6): 1444–51.
- Quinn JP and Bubb VJ. 2014. "SVA Retrotransposons as Modulators of Gene Expression." *Mobile Genetic Elements* 4: e32102.
- Raiz J, Damert A, Chira S, Held U, Klawitter S, Hamdorf M, Löwer J, Strätling WH, Löwer R, Schumann GG. 2012. "The Non-Autonomous Retrotransposon SVA Is Trans-Mobilized by the Human LINE-1 Protein Machinery." *Nucleic Acids Research* 40 (4): 1666–83.
- Reid DC, Chang BL, Gunderson SI, Alpert L, Thompson WA, Fairbrother WG. 2009. "Next-generation SELEX identifies sequence and structural determinants of splicing factor binding in human pre-mRNA sequence." *RNA* 15(12): 2385-97.
- Shen L, Wu LC, Sanlioglu S, Chen R, Mendoza AR, Dangel AW, Carroll MC, Zipf WB, Yu CY. 1994. "Structure and Genetics of the Partially Duplicated Gene RP Located Immediately Upstream of the Complement C4A and the C4B Genes in the HLA Class III Region. Molecular Cloning, Exon-Intron Structure, Composite Retroposon, and Breakpoint of Gene Duplication." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (11): 8466–76.
- Shen MR, Batzer MA and Deininger PL. 1991. "Evolution of the Master Alu Gene(s)." *Journal of Molecular Evolution* 33 (4): 311–20.
- Smit AF and Riggs AD. 1996. "Tiggers and DNA Transposon Fossils in the Human Genome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (4): 1443–48.
- Swergold GD. 1990. "Identification, Characterization, and Cell Specificity of a Human LINE-1 Promoter." *Molecular and Cellular Biology* 10 (12): 6718–29.
- Taylor MS, Altukhov I, Molloy KR, Mita P, Jiang H, Adney EM, Wudzinska A, et al. 2018. "Dissection of Affinity Captured LINE-1 Macromolecular Complexes." *eLife* 7: e30094.
- Ullu E and Tschudi C. 1984. "Alu Sequences Are Processed 7SL RNA Genes." *Nature* 312 (5990): 171–72.
- Wang H, Xing J, Grover D, Hedges DJ, Han K, Walker JA, Batzer MA. 2005. "SVA Elements: A Hominid-Specific Retroposon Family." *Journal of Molecular Biology* 354 (4): 994–1007.
- Yang F and Wang PJ. 2016. "Multiple LINEs of Retrotransposon Silencing Mechanisms in the Mammalian Germline." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 59: 118–25.

- Yang N and Kazazian HH Jr. 2006. "L1 Retrotransposition Is Suppressed by Endogenously Encoded Small Interfering RNAs in Human Cultured Cells." *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (9): 763–71.
- Yoder JA, Walsh CP and Bestor TH. 1997. "Cytosine Methylation and the Ecology of Intragenomic Parasites." *Trends in Genetics* 13 (8): 335–40.
- Zang W-Q, Li B, Huang P-Y, Lai MMC, Yen TSB. 2001. "Role of Polypyrimidine Tract Binding Protein in the Function of the Hepatitis B Virus Posttranscriptional Regulatory Element." *Journal of Virology* 75(22): 10779-10786.
- Zhu ZB, Hsieh SL, Bentley DR, Campbell RD, Volanakis DE. 1992. "A Variable Number of Tandem Repeats Locus within the Human Complement C2 Gene Is Associated with a Retroposon Derived from a Human Endogenous Retrovirus." *The Journal of Experimental Medicine* 175 (6): 1783–87.