

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

Teză de doctorat

**Explorarea potențialului de mobilizare al elementelor
hominoide VNTR-compuse PVA și FVA și identificarea
proteinelor care interacționează cu ARN-ul elementelor
SVA la oameni**

Rezumat

Conducător Științific

Prof. Dr. Nicolaie DRAGOȘ

Doctorand

Maria Bianca IANC

**Cluj-Napoca
2019**

CUPRINS

MULȚUMIRI	5
LISTA ABREVIERILOR.....	6
INDEX AL FIGURILOR	8
INDEX AL TABELELOR.....	9
1. INTRODUCERE	10
1.1 Elemente transpozabile	11
1.1.1 Clasificare.....	11
1.1.2 Mecanismul de retrotranspoziție	13
1.1.3 Mobilizarea elementelor SVA.....	14
1.1.4 Elementele VNTR compuse in genomul gibbonului	15
1.1.5 Interacțiunea elementelor L1 cu factori celulari	16
1.2 Proteinele PCBP1 și PCBP2	17
1.3 Complexul TREX.....	19
SCOPUL TEZEI	21
2. MATERIALE ȘI METODE.....	22
2.1 Culturi bacteriene, transformare și izolare de plasmide.....	22
2.1.1 Tulpini bacteriene.....	22
2.1.2 Prepararea mediilor și tampoanelor.....	22
2.1.3 Condiții de cultură pentru <i>E. coli</i>	22
2.1.4 Pregătirea bacteriilor competente, transformare și selecție.....	22
2.2 Izolarea AND-ului plasmidic	24
2.2.1 Minipreps	24
2.2.2 Midipreps	24
2.2.3 Pregătirea ADN-ului plasmidic pentru transfecție	25
2.3 Culturi de celule eucariote și analiza retrotranspoziției	25
2.3.1 Linia celulară și condiții de cultură	25
2.3.2 Analiza pentru testarea retrotranspoziției în celule	26
2.4 Izolarea acizilor nucleici	27
2.4.1 ADN	27
2.4.2 ARN	28
2.4.2.1 Izolarea ARN-ului din celule.....	28
2.4.2.2 Purificarea ARN-ului transcris in vitro	28
2.4.2.3 Izolarea ARN-ului din celule HeLa după transfecție cu ARNi.....	29
2.4.2.4 Izolarea ARN-ului după imunoprecipitare cu ARN (RIP)	30
2.5 Analiza acizilor nucleici.....	30
2.5.1 Cuantificarea spectrofotometrică	30
2.5.2 Digestia cu enzime de restricție	30
2.5.3 Completarea capetelor 5' și îndepărtarea capetelor and 3'	31
2.5.4 Ligare	31

2.5.5	Electroforeza în geluri de agaroză.....	32
2.5.5.1	ADN.....	32
2.5.5.2	ARN.....	32
2.5.6	Secvențializare	33
2.5.7	Reacția în lanț a polimerazei (PCR).....	33
2.5.7.1	Construirea amorselor	33
2.5.7.2	PCR cantitativ (qPCR).....	33
2.5.8	Transcriere inversă	34
2.5.9	Tranciere <i>in vitro</i>	35
2.5.10	Imunoprecipitare cu ARN (RIP)	35
2.6	Northern blotting	36
2.7	Evaluarea timpului de înjumătățire al ARN-ului elementelor SVA	37
2.8	Izolarea proteinelor	38
2.9	Analiza proteinelor.....	38
2.9.1	Determinarea concentrației	38
2.9.1.1	Analiza Bradford.....	38
2.9.1.2	Cuantificarea spectrofotometrică	39
2.9.2	SDS-PAGE.....	39
2.9.3	Western blotting	40
2.10	Clonare moleculară	41
2.10.1	Construcție plasmidice	41
2.11	Transfecții.....	42
2.11.1	Transfecție cu ARNi.....	42
2.11.2	Transfecție cu AND plasmidic	43
2.12	Analiza interacțiunii ARN-proteine	43
2.12.1	Purificarea de afinitate a proteinelor folosind ARN.....	43
2.12.1.1	Sinteza ARN-ului marcat.....	44
2.12.1.2	Pregătirea lizatelor celulare	45
2.12.1.3	Pregătirea bilelor de streptavidin sefaroză	45
2.12.1.4	Legarea ARN-ului de bile.....	45
2.12.2	Spectrometrie de masă	46
2.12.2.1	Achiziția datelor	46
2.12.2.2	Analiza datelor	47
2.13	Vectori plasmidici	47
3.	REZULTATE	48
3.1	Structura regiunii CT/ <i>Alu</i> -like determină potențialul de mobilizare.....	48
3.2	Elementele PVA și FVA au fost asamblate prin splicing	48
3.3	Purificarea proteinelor asociate cu SVA via 4xS1m.....	51
3.4	Confirmarea interacțiunii proteinelor PCBP1 și PCBP2 cu ARN-ul SVA.....	55
3.5	Efectul proteinelor PCBP1 și PCBP2 asupra retrotranspoziției elementelor SVA..	56
3.6	Determinarea timpului de înjumătățire a ARN-ului SVA.....	58
4.	DISCUȚII.....	59

4.1	Elementele PVA și FVA	59
4.2	Mobilizarea elementelor PVA și FVA	60
4.3	Determinanți structurali ai retrotranspoziției elementelor PVA și FVA.....	61
4.4	Proteine care interacționează cu ARN-ul elementelor SVA	62
4.5	Proteine identificate în complexe SVA RNP și L1 ORF1	64
CONCLUZII, NOUȚATEA CERCETĂRII ȘI PERSPECTIVE.....		67
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE.....		69
ANEXE.....		80
	Anexa 1	80
	Anexa 2	81
	Anexa 3	83
	Anexa 4	84
	Anexa 5	85
	Anexa 6	86
	Anexa 7	87
	Anexa 8	88
	Anexa 9	89
	Anexa 10	90
	Anexa 11	91
	Anexa 12	92
	Anexa 13	93
ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ.....		94
	Publicații aferente tezei	94
	Poster și abstract aferente tezei	94
	Subvenții aferente tezei	94

Cuvinte cheie: retrotranspozoni, compuși VNTR, SVA, potențial de mobilizare, trafic celular, proteom.

1. INTRODUCERE

1.1 Elemente genetice mobile

1.1.1 Clasificare

Elementele genetice mobile sunt secvențe repetitive de ADN care se pot deplasa în genom sau uneori între genomuri (Cordaux și Batzer, 2009). Aceste elemente sunt împărțite în două mari categorii în funcție de strategia pe care o folosesc în mobilizare și anume: ADN transpozoni și retrotranspozoni (Craig, 2015). ADN transpozonii sunt mobilizați printr-un mecanism numit "cut-and-paste", ei având capacitatea de a se exciza din genom și de a se insera într-o altă locație în genom (Craig, 2015; Parhad și Theurkauf, 2019). Mecanismul de mobilizare folosit de retrotranspozoni este cunoscut sub numele de "copy-and-paste", deoarece aceste elemente sunt mai întâi transcrise, iar apoi ARN-ul lor este procesat, transcris invers și inserat într-o nouă locație în genom (Craig, 2015; Parhad și Theurkauf, 2019).

Retrotranspozonii pot fi la rândul lor împărțiți în două categorii, în funcție de prezența sau absența repetițiilor terminale lungi (LTR), în retrotranspozoni LTR și non-LTR. Această ultimă clasă cuprinde elementele nucleare intercalate lungi (LINE) și elemente cu un număr variabil de repetiții în tandem (VNTR) (SINE-R-VNTR-Alu [SVAs]) (Savage și colab., 2019).

Retrotranspozonii care codifică proteinele necesare pentru mobilizare sunt numiți autonomi (grupul LINE1 [L1]), iar retrotranspozonii care depind pentru mobilizare de proteinele codificate de alte elemente sunt cunoscuți ca ne-autonomi (SINE și SVA depind de L1).

Elementele L1 sunt transcrise de ARN polimeraza II care își recunoaște promotorul din regiunea 5'UTR. Aceste elemente conțin două cadre de citire (ORF1 și ORF2). ORF1 codifică o proteină de legare a ARN-ului, în timp ce ORF2 codifică o proteină de 150 kDa care are atât activitate de transcriptază inversă cât și activitate endonucleazică, necesare pentru mobilizarea elementelor L1 (Lavasanifar și colab., 2019; Moran și Gilbert, 2002).

Elementele SVA sunt retrotranspozoni compuși, flancați de duplicații la situsul țintă (TSD). Aceștia conțin o regiune repetitivă simplă hexamerică CCCTCT [(CT) n] la capătul 5', urmată de regiunea asemănătoare elementelor *Alu* (*Alu*-like), domeniul VNTR și un element SINE-R (element nuclear intercalat scurt [SINE] de origine retrovirală) (Wang și colab., 2005).

1.1.2 Mobilizarea elementelor SVA

Elementele SVA sunt mobilizate *in trans* de către proteinele codificate de L1 (Raiz și colab., 2012) și sunt transcrise de către ARN polimeraza II (Wang și colab., 2005). Eficiența de mobilizare a elementelor SVA s-a dovedit a fi semnificativ atenuată atunci când repetițiile simple (CT)_n și regiunea *Alu*-like au fost eliminate, sugerând un rol important al acestor regiuni în retrotranspoziție (Raiz și colab., 2012; Hancks și colab., 2012).

1.1.3 Interacțiunea elementelor L1 cu factori celulari

Factorii celulari care interacționează cu ARN-ul elementelor L1 în celulă sunt din diferite categorii funcționale cum ar fi complexul RNP, splicing, transcrierea și reglarea post-transcriere a ARN-ului, conjugarea ubl sau stabilitatea ARNm (Goodier și colab., 2013).

Retrotranspoziția elementelor L1 poate fi inhibată de mai mulți factori celulari cum ar fi proteinele APOBEC3 (Wissing și colab., 2011; Liang și colab., 2016), helicase MOV10 (Li și colab., 2013), enzima SAMHD1 (Hu și colab., 2015), proteina antivirală zinc-finger (Moldovan și Moran, 2015), PABPN1 și PABPC1 (Dai et al., și colab., 2012). Proteina SAMHD1 a fost de asemenea identificată ca având un efect inhibitor asupra retrotranspoziției elementelor SVA (Zhao și colab., 2013).

1.2 Proteinele PCBP1 și PCBP2

Proteinele de legare a secvențelor bogate în citozină (poly(C)-binding proteins) (PCBP) sunt proteine care recunosc secvențe bogate în citozină din ADN sau ARN, fiind implicate în multe procese biologice cum ar fi stabilitatea ARNm, inhibarea sau intensificarea traducerii (Choi și colab. 2009; Geuens, Bouhy și Timmerman, 2016; Makeyev și Liebhaber, 2002). Proteinele PCBP1 și PCBP2 conțin trei domenii (hnRNP K-homology [KH]) responsabile de legarea acidului nucleic, două dintre acestea fiind localizate la capătul N al proteinei, urmate de o secvență de lungime variabilă și de al treilea domeniu KH la capătul C al proteinei (Du și colab., 2005).

PCBP2 a fost raportată anterior ca făcând parte din complexe proteice L1 ORF1 și a fost identificat atât în extracte nucleare cât și în extracte citoplasmice (Goodier și colab., 2013). De asemenea, s-a demonstrat că această proteină se găsește localizată împreună cu proteina ORF1 și LARP1 în granulele citoplasmice în celule 2102Ep.

1.3 Complexul TREX

Proteinele din complexul TREX, au fost identificate prima dată în drojdie, fiind implicate în reglarea transcrierii ARNm, în procesarea și exportul nuclear al acestuia (Katahira, 2012). Acest complex multiplu de proteine (denumit THO) este compus din proteinele Thoc (Thoc1, Thoc2, Thoc3, Thoc5, Thoc6 și Thoc7) și UAP56, ALY/REF și CIP29 (Delaleau și Borden, 2015). În ceea ce privește rolul complexului TREX în traficul celular al elementelor mobile,

într-o linie germinativă de *Drosophila*, s-a demonstrat că Thoc5 și alte componente TREX sunt importante în procesarea ARN-urilor de dimensiuni mici, care controlează exprimarea elementelor mobile (Hur și colab., 2016). Complexul TREX nu este necesar pentru retrotranspoziția elementelor Ty1 de la drojdie, în plus, prezența acestuia putând inhiba inserarea acestor elemente în genom (Manhas și colab., 2018).

OBIECTIVELE TEZEI

Scopurile acestui studiu au fost: i) investigarea potențialului de mobilizare a două familii noi de retrotranspozoni ne-autonomi (elementele compuse PVA și FVA) identificate în genomul gibbonului și ii) explorarea proteomului asociat ARN-ului elementelor SVA și posibilele sale roluri în mobilizarea acestor elemente genetice mobile.

2. MATERIALE ȘI METODE

2.1 Culturi bacteriene, transformare și izolarea plasmidelor

2.1.1 Tulpini bacteriene

Tulpina bacteriană folosită pentru în clonare în acest studiu a fost tulpina de *Escherichia coli* DH5a (Grant și colab., 1990).

2.1.2 Condițiile de cultură pentru *E. coli*

Bacteriile au fost cultivate peste noapte în mediu Luria-Bertani (LB) la 37°C și 200 RPM sau pe plăci de agar LB la aceeași temperatură. LB-agar a fost amestecat cu ampicilină care a fost antibioticul utilizat pentru selecția bacteriilor transformate, la o concentrație finală de 50 mg/l.

2.1.3 Pregătirea bacteriilor competente, transformarea și selecția

Celulele competente au fost pregătite folosind protocolul publicat de Chung și Miller (Chung & Miller, 1993).

Bacteriile au fost transformate printr-o metodă chimică. Toți vectorii utilizați conțin gena care le conferă rezistență la ampicilină, aceasta fiind utilizată ca marker de selecție în bacterii.

2.2 Izolarea ADN-ului plasmidic

2.2.1 Minipreps

Pentru scopuri analitice care nu necesită cantități mari de ADN (de exemplu, digestiile de control sau secvențializări), purificarea ADN-ului plasmidic a fost efectuată pe baza denaturării alcaline selective a ADN-ului cromozomial, în timp ce ADN-ul circular cu greutate moleculară mică a rămas dublu catenar (Birnboim și Doly, 1979). Această metodă folosește dodecil sulfat de sodiu (SDS) și hidroxid de sodiu pentru liză și denaturare, urmate de neutralizarea cu acetat de potasiu care reținează ADN-ul, determină formarea de agregate din ADN, proteine și ARN și ne permite să purificăm ADN-ul plasmidic care rămâne în supernatant.

2.2.2 Midipreps

Pentru transfecția celulelor umane, transcrierea *in vitro* și clonarea pentru care a fost necesară o cantitate mai mare de ADN plasmidic, s-a realizat izolarea acestuia folosind kitul PeqGOLD XChange Plasmid Midi (Peqlab, Erlangen, Germania). Acest kit pentru midiprep utilizează coloane cu schimb de anioni de pe care ADN-ul este eluat și apoi purificat prin precipitare cu izopropanol, urmată de spălare cu etanol.

2.3 Culturi celulare eucariote și analiza retrotranpoziției

2.3.1 Linia celulară și condițiile de cultură

Pentru experimentele *in vivo*, au fost utilizate celule HeLa HA care au fost furnizate cu amabilitate de către J. Moran (Universitatea de Medicină din Michigan, Michigan, SUA).

Celulele HeLa au fost crescute în mediu Eagle Dulbecco modificat (DMEM) (Lonza, Basel, Elveția) 4,5 g/l glucoză suplimentat cu 10% FCS (Lonza, Basel, Elveția și Biowest, Nuaille, Franța), 2 mM glutamină (Lonza, Basel, Elveția) și 100 U/ml Pen-Strep (Lonza, Basel, Elveția).

2.3.2. Analiza pentru testarea retrotranspoziției în celule

Potențialul de mobilizare al rocadelor realizate prin schimbul de domenii între SVA și PVA/FVA a fost măsurat cu ajutorul unui test de retrotranspoziție în celule, și se bazează pe utilizarea unei casete reporter *mneoI* (Freeman și colab., 1994; Moran și colab., 1996). Potențialul de retrotranspoziție a fost testat în celule HeLa HA, utilizând L1RP uman pentru a furniza proteinele necesare mobilizării (Kimberland și colab., 1999). Folosirea acestei casete reporter asigură că celulele transfectate vor fi rezistente la neomicină numai după ce rocadele vor fi transcrise, procesate și reintegrate în genom.

2.4 Analiza acizilor nucleici

2.4.1 Transcrierea inversă

Sinteza de ADNc a fost realizată din ARN total izolat din celule HeLa, folosind transcriptază inversă SuperScript II (cataloger 18064, Invitrogen, Carlsbad, SUA) sau kitul Verso cDNA (catalogul AB1453A, Thermo Scientific, Waltham, USA).

2.4.2 Transcrierea *in vitro*

Pentru a obține ARN-ul dorit necesar pentru analiza de purificare a proteinelor cu ajutorul unui ARN, am efectuat transcriere *in vitro*. Mai întâi, vectorii care conțin secvența dorită au fost liniarizați cu o enzimă de restricție (care taie într-un singur loc) și apoi a fost pregătită reacția de transcriere *in vitro*. Riboprobele marcate cu biotină și folosite în Northern blotting au fost generate prin transcriere *in vitro*, adăugând biotină-16-UTP împreună cu ATP, CTP și GTP.

2.4.3 Imunoprecipitarea ARN-ului (RIP)

RIP se bazează pe precipitarea unei proteine și a ARN-ului de care aceasta se leagă specific. Tehnica a fost utilizată în acest studiu pentru a confirma legarea proteinelor PCBP1 și PCBP2 de ARN-ul elementelor SVA.

În primul rând, celulele HeLa HA au fost însămânțate pe plăci Petri de 150 mm. Celulele au fost apoi transfectate 24 de ore mai târziu fie cu vectorul de exprimare care conține elementul SVA (pcDNA3SVA), fie cu vectorul fără SVA (pcDNA3) pentru control. A doua zi, RIP a fost efectuată urmând pașii următori: prepararea bilor magnetice pentru imunoprecipitare, prepararea lizatului celular și analiza RIP.

2.5 Northern blotting

Northern blotting a fost efectuată utilizând kitul NorthernMax-Gly de la Life Technologies (cat. Nr. AM1946, Carlsbad, USA) urmând pașii principali descriși de producători. Principalul avantaj al acestui kit este acela că utilizează glicoxal dimetilsulfoxid (DMSO) pentru a denatura ARN; prin urmare, utilizarea formaldehidei a fost evitată.

2.6 Evaluarea timpului de înjumătățire al ARN-ului SVA

Timpul de înjumătățire al ARN-ului elementelor SVA a fost evaluat utilizând actinomicina D. Mai întâi celulele au fost transfectate cu ARNi PCBP2 sau cu ARNi de control, iar după 24 de ore, celulele au fost transfectate cu pCEP4 SVApA. După alte 24 de ore de la cea de a doua transfecție, celulele au fost împărțite în șase plăci de 3,5 cm în care a doua zi s-a adăugat actinomicină D la o concentrație finală de 1 ug/ml și s-a izolat ARN-ul total la următoarele intervale de timp: 0h, 2h, 4h, 6h, 8h și 10h.

2.7 Izolarea proteinelor

Pentru obținerea lizatelor celulare s-au folosit diferite protocoale în funcție de experimentele în care au fost folosite. Pentru analiza de purificare a proteinelor care se leagă de ARN, acestea au fost extrase folosindu-se un protocol publicat (Leppek & Stoecklin, 2014) care presupune în principal izolarea proteinelor din celule HeLa crescute în 20 de vase Petri de 150 mm folosind azot lichid și bile de oțel de 5 mm.

2.8 Clonarea moleculară

2.8.1 Constructe plasmidice

Pentru a determina partea structurală a elementelor VNTR compuse care este responsabilă de mobilizare, am construit rocade de domenii între SVA (pADSVA_E [Raiz și colab. 2012]), PVA și FVA. Pentru crearea rocadelor, repetițiile hexametrice (CT)_n și domeniul *Alu*-like dintr-un element au fost legate de regiunea VNTR și partea 3' a altui element.

2.9 Transfecții

2.9.1 Transfecția cu ARN de interferență (ARNi)

Pentru a determina importanța proteinelor identificate în procesul de mobilizare, rata de retrotranspoziție a fost evaluată după ce expresia acestor proteine a fost inhibată de ARNi. Acest ARN dublu catenar este de aproximativ 20-25 bp în lungime și interferează cu ARNm, astfel încât acesta nu va mai putea fi tradus în proteine. Inhibarea proteinelor a fost măsurată la 48 și 72 de ore după transfecție.

2.9.2 Transfecția cu ADN plasmidic

Pentru testarea ratei de retrotranspoziție în celule umane, am folosit un protocol descris anterior (Raiz și colab., 2012).

După transfecție, celulele au fost incubate timp de 24 de ore și apoi mediul a fost schimbat în mediu cu higromicină. Selecția cu higromicină a continuat timp de 12 zile, iar apoi celulele au fost tripsinizate și transferate în mediu cu G418, urmată de colorarea cu Giemsa după 12 zile.

2.10 Analiza interacțiunilor ARN-proteină

2.10.1 Purificarea de afinitate a proteinelor cu ajutorul ARN-ului

Pentru a identifica proteinele care interacționează cu ARN-ul elementelor SVA, am ales un sistem care utilizează patru copii ale unui aptamer de streptavidină modificat (S1m), care trebuie clonat la capătul 3' al secvenței țintă. Metoda care folosește acest sistem a fost utilizată pe baza unui protocol publicat de Leppek (Leppek și Stoecklin 2014). Purificarea proteinelor cu ajutorul ARN-ului presupune legarea acestuia de bile de sefaroză, urmată de legarea proteinelor la ARN-ul deja legat și, în final, eluarea proteinelor legate cu RNază.

Proteinele pe care le-am purificat folosind această metodă, au fost vizualizate mai întâi pe geluri de poliacrilamidă (SDS-PAGE) iar apoi pregătite pentru a fi identificate prin spectrometrie de masă.

3. REZULTATE

3.1 Structura regiunii CT/*Alu*-like determină potențialul de mobilizare

Pentru a testa dacă secvența și structura specifică a domeniului de la capătul 5' (repetițiile CT și *Alu*-like) al elementelor VNTR compuse sunt responsabile pentru mobilizare, am creat rocade între aceste elemente prin fuzionarea domeniului CT/*Alu*-like din elementele SVA cu regiunea VNTR și partea 3' a elementelor PVA și FVA (SP și SF) și domeniul CT/*Alu*-like din elementele PVA și FVA a fost fuzionat cu domeniul VNTR și partea 3' al elementelor SVA (PS și FS). Rata de retrotranspoziție a elementelor SP și SF a fost mai mare comparativ cu cea a elementelor PVA și FVA (Ianc și colab., 2014), iar elementele PS și FS au avut o rată de mobilizare redusă comparativ cu elementele SVA.

3.2 Elementele PVA și FVA au fost asamblate prin splicing

Deoarece splicing-ul a fost identificat ca mecanismul responsabil pentru formarea elementelor PVA și FVA (Ianc și colab., 2014), am vrut să vedem dacă există splicing-uri suplimentare care ar putea avea un impact asupra cantității totale de ARN-*mneol* procesat care ar putea explica potențialul scăzut de mobilizare pentru cele două elemente. Analiza Northern blotting ne-a ajutat să identificăm un al doilea situs donor de splicing în domeniul VNTR și un situs acceptor de splicing la capătul 3' al cadrului de citire al neomicin fosfotransferazei (*neo*) (Ianc și colab., 2014), susținând predicțiile conform cărora elementele PVA și FVA au fost asamblate prin splicing (Ianc și colab., 2014). A fost observată o cantitate mare de ARN-*mneol* procesat disponibil pentru retrotranspoziție pentru elementele PVA și FVA, astfel încât rata lor scăzută de mobilizare nu poate fi atribuită disponibilității ARN-ului. Cu toate acestea, pentru elementul FS s-a observat o cantitate mai mică de ARN-*mneol* procesat disponibilă, astfel că în acest caz poate exista o legătură între disponibilitatea ARN-ului și potențialul de mobilizare.

4. DISCUȚII

4.1 Elementele PVA și FVA

În genomul gibbonului, patru familii de elemente VNTR compuse flancate de duplicații la situsul țintă (TSD) au fost identificate (Carbone și colab., 2012, Carbone și colab., 2014, Ianc și colab., 2014). Toate cele patru familii de compuși VNTR au aceeași structură reprezentată de repetițiile hexamerice CCCTCT, urmate de domeniu *Alu*-like, regiunea VNTR și o parte 3' variabilă între familii (Ianc și colab., 2014). Elementele PVA conțin, la capătul 3' o secvență unică caracteristică elementelor SVA2, urmată de un fragment din gena prostaglandin reductazei 2 (PTGR2) (exonul 4 și partea 5' a intronului 4) (Ianc și colab., 2014). Elementele FVA sunt caracterizate printr-un capăt 3' care conține o parte dintr-un element FRAM (Free Right *Alu* Monomer), flancat de secvențe nerepetitive (Ianc și colab., 2014).

4.2 Mobilizarea elementelor FVA și PVA

Elementele PVA și FVA identificate în genomul gibbonului au fost observate ca având un număr mic de copii, de 143 și respectiv 11 (Ianc și colab., 2014), sugerând că ar putea exista o regiune specifică în aceste elemente care să le inhibe mobilizarea sau e posibil să interacționeze cu anumiți factori inhibitori. Repetițiile hexamerice CCCTCT și regiunea *Alu*-like a elementelor SVA au fost observate anterior ca fiind esențiale în retrotranspoziție (Raiz și colab., 2012; Hancks și colab., 2012).

4.3. Determinanți structurali ai retrotranspoziției elementelor PVA și FVA

Rocadele între domeniile elementelor SVA și PVA/FVA au fost create prin schimbarea repetițiilor (CCCTCT)_n și a regiunii *Alu*-like. Rocadele care conțin repetițiile (CCCTCT)_n și regiunea *Alu*-like de la elementele SVA și regiunea VNTR și partea 3' din elementele PVA și

FVA sunt mobilizate mai eficient, rata lor de mobilizare fiind similară cu cea a elementelor SVA. Prin comparație, rocadele care au partea 5' de la elementele PVA și FVA și regiunea VNTR și capătul 3' din elementele SVA au o rată de mobilizare similară cu elementele PVA și FVA. Pe baza acestor rezultate putem concluziona că nu prezența repetițiilor (CCCTCT)_n și a regiunii *Alu*-like este importantă pentru mobilizarea eficientă a elementelor VNTR compuse, ci structura lor specifică.

CONCLUZII, NOVELITATE DE CERCETARE ȘI PERSPECTIVE

Acest studiu confirmă importanța regiunii 5' (regiunea CT/*Alu*-like) în retrotranspoziția compușilor VNTR.

Aici, oferim un prim studiu în care sunt descrise proteinele care interacționează cu ARN-ul elementelor SVA. Acest studiu poate fi considerat un punct de plecare pentru confirmarea viitoare a altor proteine identificate aici și a impactului acestora asupra retrotranspoziției.

Pentru a strânge mai multe informații despre traficul elementelor VNTR compuse în celulă, ar fi necesar să se identifice și proteinele care interacționează cu ARN-ul elementelor PVA și FVA.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- Birnboim+, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7: 1513–1523.
- Carbone, L., Harris, R. A., Gnerre, S., Veeramah, K. R., Lorente-Galdos, B., Huddleston, J. et al. (2014). Gibbon genome and the fast karyotype evolution of small apes. *Nature*, 513: 195–201.
- Carbone, L., Harris, R. A., Mootnick, A. R., Milosavljevic, A., Martin, D. I., Rocchi, M. et al. (2012). Centromere remodeling in Hoolock leuconedys (Hylobatidae) by a new transposable element unique to the gibbons. *Genome Biology and Evolution*, 4: 648–658.
- Choi, H. S., Hwang, C. K., Song, K. Y., Law, P.-Y., Wei, L.-N., & Loh, H. H. (2009). Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380: 431–436.
- Chung, C. T., & Miller, R. H. (1993). Preparation and storage of competent Escherichia coli cells. *Methods in Enzymology*, 218: 621–627.
- Cordaux, R., & Batzer, M. A. (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Review Genetics*, 10: 691–703.
- Craig, N. L. (2015). A moveable feast: an introduction to mobile DNA. In: Craig, N. L., Chandler, M., Gellert, M., Lambowitz, A. M., Rice, A. R., Sandmeyer, S. B., editors. Mobile DNA III. *ASM Press*, 1–39.
- 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: 4323–4336.
- Delaleau, M., & Borden, K. L. B. (2015). Multiple Export Mechanisms for mRNAs. *Cells*, 4: 452–473.
- Du, Z., Lee, J. K., Tjhen, R., Li, S., Pan, H., Stroud, R. M., & James, T. L. (2005). Crystal structure of the first KH domain of human poly(C)-binding protein-2 in complex with a C-rich strand of human telomeric DNA at 1.7 Å. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 38823–38830.
- Freeman, J. D., Goodchild, N. L., & Mager, D. L. (1994). A modified indicator gene for selection of retrotransposition events in mammalian cells. *BioTechniques*, 17: 46, 48–49, 52.
- Geuens, T., Bouhy, D., & Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Human Genetics*, 135: 851–867.
- 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: 7401–7419.
- Grant, S. G. N., Jesseet, J., Bloomt, F. R., & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants (bacterial restriction/DNA methylation/cloning mammalian DNA/heterogeneous transgene expression/insulin gene regulation). *Genetics*, 87: 4645–4649.
- Hancks, D. C., & Kazazian Jr., H. H. (2012). Active human retrotransposons: variation and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 22:191–203.
- Hancks, D. C., Mandal, P. K., Cheung, L. E., & Kazazian Jr., H. H. (2012). The minimal active human SVA retrotransposon requires only the 5'-hexamer and Alu-like domains. *Molecular and Cellular Biology*, 32: 4718–4726.
- Hu, S., Li, J., Xu, F., Mei, S., Duff, Y. Le, Yin, L. et al. (2015). SAMHD1 inhibits LINE-1 retrotransposition by promoting stress granule formation. *PLOS Genetics*, 11: e1005367, 1–27.
- Hur, J. K., Luo, Y., Moon, S., Ninova, M., Marinov, G. K., Chung, Y. D., & Aravin, A. A. (2016). Splicing-independent loading of TREX on nascent RNA is required for efficient expression of dual-strand piRNA clusters in *Drosophila*. *Genes & Development*, 30: 840–855.
- 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: 2847–2864.
- Katahira, J. (2012). mRNA export and the TREX complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819: 507–513.
- Kimberland, M. L., Divoky, V., Prchal, J., Schwahn, U., Berger, W., & Kazazian, H. H. (1999). Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Human Molecular Genetics*, 8: 1557–1560.
- Lavasanifar, A., Sharp, C. N., Korte, E. A., Yin, T., Hosseinnejad, K., & Jortani, S. A. (2019). Long interspersed nuclear element-1 mobilization as a target in cancer diagnostics, prognostics and therapeutics. *Clinica Chimica Acta*, 493: 52–62.
- Leppek, K., & Stoecklin, G. (2014). An optimized streptavidin-binding RNA aptamer for purification of ribonucleoprotein complexes identifies novel ARE-binding proteins. *Nucleic Acids Research*, 42: e13, 1–15.
- Li, X., Zhang, J., Jia, R., Cheng, V., Xu, X., Qiao, W. et al. (2013). The MOV10 helicase inhibits LINE-1 mobility. *The Journal of Biological Chemistry*, 288: 21148–21160.

- Makeyev, A. V., & Liebhaber, S. A. (2002). The poly(C)-binding proteins: A multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA*, 8: 265–278.
- Manhas, S., Ma, L., & Measday, V. (2018). The yeast Ty1 retrotransposon requires components of the nuclear pore complex for transcription and genomic integration. *Nucleic Acids Research*, 46: 3552–3578.
- Moldovan, J. B., & Moran, J. V. (2015a). The Zinc-Finger Antiviral Protein ZAP Inhibits LINE and Alu Retrotransposition. *PLoS Genetics*, 11(5), e1005121. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005121>
- Moldovan, J. B., & Moran, J. V. (2015). The Zinc-Finger Antiviral Protein ZAP Inhibits LINE and Alu Retrotransposition. *PLoS Genetics*, 11: e1005121, 1–34.
- Moran, J. V., & Gilbert, N. (2002). Mammalian LINE-1 retrotransposons and related elements. In: Craig, N. L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A. M., editors. *Mobile DNA II*. ASM Press, 836–869.
- Moran, J. V., Holmes, S. E., Naas, T. P., DeBerardinis, R. J., Boeke, J. D., & Kazazian, H. H. (1996). High Frequency Retrotransposition in Cultured Mammalian Cells. *Cell*, 87: 917–927.
- Parhad, S. S., & Theurkauf, W. E. (2019). Rapid evolution and conserved function of the piRNA pathway. *Royal Society Open Biology*, 9: 1–13.
- Raiz, J., Damert, A., Chira, S., Held, U., Klawitter, S., Hamdorf, M. et al. (2012). The non-autonomous retrotransposon SVA is trans-mobilized by the human LINE-1 protein machinery. *Nucleic Acids Research*, 40: 1666–1683.
- Wang, H., Xing, J., Grover, D., Hedges, D. J., Han, K., Walker, J. A., & Batzer, M. A. (2005). SVA elements: a hominid-specific retroposon family. *Journal of Molecular Biology*, 354: 994–1007.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 286: 36427–36437.
- Zhao, K., Du, J., Han, X., Goodier, J. L., Li, P., Zhou, X. et al. (2013). Modulation of LINE-1 and Alu/SVA retrotransposition by Aicardi-Goutières syndrome-related SAMHD1. *Cell Reports*, 4: 1108–1115.