

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-Matematički Fakultet – Biološki Odsjek

Jan Harapin

Karakterizacija *Ty3/gypsy* LTR retrotranspozona iz vrste *Anemone hortensis* L.

Zagreb, 2009.

„Ovaj rad izrađen je u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom Prof. dr. sc. Višnje Besendorfer i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2008/2009.“

Htio bih zavaliti...

...mentorici, Prof. dr. sc. Višnji Besendorfer, što mi je dala priliku za izradu ovog rada i pritom pružila iznimno mnogo podrške u tehničkom kao i intelektualnom smislu. Također zahvaljujem na ukazanom povjerenju i neizmjernom strpljenju prilikom izvođenja pokusa koji su se u nekim trenucima pokazali zahtijevnijima nego što sam to ja očekivao.

...Luki Bočkoru na svekolikoj podršci koju mi je pružio tijekom izrade ovog rada, posebice u ključnim trenucima kada mi je to bilo najpotrebnije.

...Dr. sc. Nenadu Malenici na izuzetno strpljivom pojašnjavanju nejasnoća i praktičnoj podršci.

...Dr. sc. Jeleni Mlinarec na mentoriranju i nadgledanju praktičnog dijela mog rada.

...svim članovima Zavoda za molekularnu biologiju na korisnim savjetima i druženju.

## Sadržaj

1.	Uvod.....	5
1.1.	Organizacija eukariotskog genoma.....	5
1.2.	Pokretni genetički elementi.....	6
1.3.	Retrovirusi i LTR retrotranspozoni.....	9
1.4.	<i>Ty3/gypsy</i> ili <i>romani</i> skupina LTR retrotranspozona.....	12
1.5.	Organizacija ponavljajuće DNA u rodu <i>Anemone</i> .....	13
2.	Cilj istraživanja .....	15
3.	Materijali i metode .....	16
3.1.	Materijal.....	16
3.1.1.	Kemikalije.....	16
3.1.2.	Enzimi i komercijalni pripravci .....	16
3.1.3.	Početnice korištene za lančanu reakciju polimerazom (PCR) .....	17
3.1.4.	Biljezi molekularne mase.....	17
3.1.5.	Plazmidi .....	18
3.1.6.	Bakterijski sojevi.....	19
3.1.7.	Hranidbene podloge za uzgoj i rast bakterijskih sojeva.....	19
3.1.8.	Tehnička oprema.....	20
3.2.	Metode .....	22
3.2.1.	Izolacija genomske DNA i umnažanje DNA odsječaka pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) .....	22
3.2.2.	Kloniranje odsječaka dobivenih PCR-om.....	24
3.2.3.	Priprema elektrokompetentnih stanica.....	25
3.2.4.	Priprema kemijski kompetentnih bakterijskih stanica .....	25
3.2.5.	Transformacija elektroporacijom i temperaturnim šokom.....	26
3.2.6.	Izolacija plazmidne DNA i sekvenciranje.....	27
4.	Rezultati .....	28

4.1.	Značajke AhDR porodice ponavljajuće DNA iz vrste <i>Anemone hortensis</i> .....	28
4.2.	Filogenetska analiza <i>Ty3/gypsy</i> retrotranspozona na temelju slijeda rve.....	29
4.3.	Umnažanje DNA između gena za reverznu transkriptazu (RT) i integrazu (INT) u vrstama <i>A. hortensis</i> i <i>A. nemorosa</i> .....	30
4.4.	Analiza sljedova DNA u području između gena za reverznu transkriptazu i integrazu..	32
5.	Rasprava.....	37
6.	Zaključak.....	40
7.	Zahvale.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8.	Popis literature.....	41
9.	Sažetak .....	46
10.	Summary .....	47

## 1. Uvod

### 1.1. Organizacija eukariotskog genoma

Genetički materijal eukariota nalazi se u jezgri, posebnom staničnom odjeljku gdje je gusto pakiran s histonskim i nehistskim proteinima u strukture koje se nazivaju kromosomi. Građevna tvar kromosoma naziva se kromatin i dijeli se na heterokromatin i eukromatin ovisno o gustoći pakiranja, te s njom povezanim različitim posttranslacijskim modifikacijama histona. Eukromatin predstavlja DNA koja se replicira u ranoj S fazi dok se heterokromatinska područja repliciraju u kasnoj S fazi staničnog ciklusa a nalaze se centromerno/pericentromerno, interkalarno i telomerno na kromosomima. Eukariotski genom sastavljen je od velikog broja različitih ponavljajućih sljedova nukleotida (Britten i Kohne, 1968), koji se dijele na:

- **Visoko ponavljajući sljedovi** – satelitska i telomerna DNA
- **Umjereno ponavljajući sljedovi** – pokretni genetički elementi, geni za aktin i globin, te geni za ribosomsku RNA (rRNA), transportnu RNA (tRNA) i histone
- **Jedinstveni sljedovi DNA**

Ponavljajuće sljedove DNA možemo podijeliti ovisno o duljini osnovne ponavljajuće jedinice na mikrosatelitsku DNA (2-5 pb), minisatelitsku DNA (15-100 pb) i satelitsku DNA (2-1000 pb), i rasporedu osnovne ponavljajuće jedinice na uzastupno ponavljajuće i raspršene sljedove. U raspršene sljedove ubrajaju se pokretni genetički elementi (Charlesworth i sur., 2004).

Već odavno je primijećeno da kod eukariota veličina genoma nije izravno povezana s njegovom složenošću neovisno o tome da li se složenost genoma iskazuje kroz ukupni broj gena, odnosno kodirajućih sljedova, ili brojem različitih tipova stanica, što je poznato kao paradoks C vrijednosti (C vrijednost označava veličinu haploidnog genoma). Kod eukariota razlici u veličini genoma najviše pridonosi velika količina nekodirajućih sljedova za koje se dugo mislilo da ničemu ne služe, odatle i ime „*junk*“ DNA (prema eng. *junk*=otpad). Međutim, istraživanja su pokazala da većina ponavljajuće DNA potječe upravo od pokretnih genetičkih elemenata (čovjek 45%, rod *Lilium* do 90%) što ide u prilog pretpostavci o njenoj važnoj ulozi (Leeton i Smyth, 1993; Lander i sur., 2001). Cavalier-Smith i Beaton (1999) postavili su hipotezu o takozvanoj skeletnoj DNA koja kaže da je za optimalnu razinu funkcioniranja stanice ključan odnos između

jezgre i citoplazme, odnosno da stanični volumen i volumen jezgre (veličina genoma) moraju biti u ravnotežnom odnosu. U skladu s tom hipotezom ide pretpostavka da je „junk“ DNA zapravo skeletna (potporna) DNA s ulogom održavanja kritičnog jezgrinog volumena. Za stanicu je jeftinije i učinkovitije održavati jezgrin volumen pomoću pokretnih genetičkih elemenata i druge nekodirajuće DNA nego nagomilavanjem gena. Tome u prilog govore rezultati sekvenciranja genoma različitih organizama kod kojih je utvrđeno relativno malo gena u odnosu na veličinu genoma. Nakon završetka projekta sekvenciranja ljudskog genoma utvrđen je znatno manji broj gena u ljudskom genomu, koji iznosi svega oko 30,000, od očekivanog (Lander i sur., 2001; Venter i sur., 2001). U usporedbi s brojem gena kod vrste *Cenorabditis elegans*, koji iznosi 20,000 gena (Consortium, 1998), razlika u broju gena između čovjeka i *C. elegans* nije tako velika kako bi se moglo očekivati obzirom na kompleksnost građe organizama i vremena koje je proteklo od njihovog evolucijskog razdvajanja.

Raspršena ponavljanja uglavnom se nalaze na svim kromosomima i to u eukromatinskim područjima kao što se to dobro vidi na primjeru vrsta *Vicia faba* (Frediani i sur., 1999) i *Pisum sativum* (Neumann i sur., 2001) primjenom tehnike fluorescencijske hibridizacije *in situ* (FISH). Znatno manje je prisutna u telomerama, centromerima, nukleolarnim organizatorima (NOR) i heterokromatinskim blokovima u kojima se već nalazi satelitska DNA (Staginnus i sur., 1999). Takva raspodjela objašnjava se važnom ulogom tih područja u pravilnom odvijanju staničnog ciklusa, sparivanju i razdvajanju kromosoma te sintezi ribosoma. Međutim, ima primjera vrsta kod kojih se pokretni genetički elementi nakupljaju u pericentromernom području (*Cicer arietinum*, Staginnus i sur., 1999; vrste iz porodice Gramineae, Ito i sur., 2004) preuzimajući ključnu ulogu u kontroli staničnog ciklusa. Općenito, može se reći da se količina pokretnih genetičkih elemenata kao i njihova očuvanost u genomima razlikuje između srodnih vrsta.

## 1.2. Pokretni genetički elementi

**Pokretni genetički elementi (PGE)** obuhvaćaju transpozone (insercijske sekvence, DNA transpozoni i retrotranspozoni), plazmide, bakteriofage, te introne skupine II. Oni su molekularni prijenosnici ili vektori koji neovisni o kromosomima (vankromosomski elementi) omogućuju horizontalni prijenos genetičke informacije i na taj način omogućuju razvoj genoma

na molekularnoj razini i predstavljaju izvor novih sljedova nukleinskih kiselina ili promjena u rasporedu već postojećih sljedova. Transpozoni se mogu podijeliti u dvije glavne skupine, **DNA transpozone** (skupina I) i **RNA transpozone** (retrotranspozoni ili retroelementi) koji koriste RNA kao međuprodukt tijekom životnog ciklusa (skupina II).

Transpozoni se unutar genoma premještaju transpozicijom koja se odvija replikativnim i nereplikativnim mehanizmima. U replikativnom mehanizmu dolazi do udvostručenja elementa tijekom transpozicije na način da je premještena jedinica ponavljanja zapravo kopija izvornog elementa pri čemu jedna kopija ostaje na izvornom mjestu dok se druga nasumično ili ciljano („*hotspots*“) ugrađuje na drugo mjesto u genomu te na taj način transpoziciju prati povećanje broja kopija transpozona. U ovaj procese transpozicije uključeni su enzimi *transpozaza*, koja djeluje na krajeve izvornog transpozona i *rezolvaza* koja razrješava udvostručene kopije vezane u strukturi koja predstavlja međuproizvod replikativnog načina transpozicije. U nereplikativnom mehanizmu transpozicije element se kreće kao odvojena jedinica ponavljanja izravno s jednog mjesta na drugo pri čemu je potrebna samo transpozaza. Obzirom da izostaje replikacija element ostaje očuvan. Za popravak mjesta dvolančanog loma koje ostaje nakon nereplikativnog načina širenja transpozona odgovorni su stanični mehanizmi popravka. Kroz transpoziciju i umnažanje transpozoni u znatnoj količini doprinose raznolikosti genoma. Obilježje transpozona jest da ne koriste neki samostalan oblik pokretnog elementa, poput faga ili plazmidne DNA, već se izravno kreću s jednog mjesta na drugo unutar genoma. Transpozoni nisu ograničeni samo na pomicanje samih sebe već ponekad dolazi do premještanja drugih dijelova DNA na nova mjesta unutar istog genoma te su na taj način često izvor velikog broja mutacija. Pojam “molekularno udomljavanje”, koji je uveo Wolfgang Miller (1997) odnosi se na činjenicu da je u svrhu razvoja nekog genoma isplativije presložiti postojeće sljedove radi postizanja novih funkcija ili utišavanja starih, nego stvarati odnosno gomilati nove sljedove nukleinskih kiselina (Miller i sur.,1997). Imajući to na umu postaje jasnija moguća uloga pokretnih genetičkih elemenata u usmjeravanju razvoja genoma (Nekrutenko i Li, 2001).

**DNA transpozone** nalazimo i kod prokariota i eukariota. Genom može sadržavati funkcionalne i nefunkcionalne (defektne) primjerke ovih elemenata. Većina pokretnih elemenata u eukariotskim genomima je defektna bez mogućnosti neovisnog premještanja, iako ih kao supstrate mogu prepoznavati enzimi koje proizvode funkcionalni transpozoni. Transpozonski



elementi prvi su puta uočeni na molekularnoj razini u obliku spontanih ugradnji u bakterijske operone. Takva ugradnja sprječava transkripciju i/ili translaciju gena u kojem je došlo do ugradnje pokretnog elementa. Najjednostavniji transpozoni su **insercijske sekvence (IS)**. Elementi IS normalni su dio bakterijskih kromosoma i plazmida. Oni su samostalne jedinice i svaka kodira samo za one proteine koji su joj potrebni za transpoziciju. One završavaju kratkim obrnutim ponavljanjima i obično su dvije kopije ponavljanja blisko srodne ali nisu identične. Kada element IS mijenja mjesto u genomu, domaćinska DNA na mjestu ugradnje biva udvostručena. Na mjestu ugradnje elementa IS, s obje strane prisutna su kratka izravna ponavljanja, koja su posljedica udvostručenja nakon ugradnje. Transpozoni **Tn**, uz ostale funkcije potrebne za transpoziciju, nose selektivnu prednost na antibiotike. **Složeni elementi** imaju središnje područje koje nosi otpornost na antibiotik omeđenu elementima IS s obje strane pri čemu elementi IS mogu biti u izravnoj ili obrnutoj orijentaciji. Funkcionalni IS modul može premještati sebe ili cijeli transpozon. Također postoje i **Helitroni**, neautonomni DNA elementi opisani kod vrsta *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* i *Caenorhabditis elegans* (Feschotte i sur., 2002). Kod biljaka su u velikom broju kopija prisutni DNA elementi **MITE** (eng. Miniature Inverted Repeat Transposable Element) (Bureau i Wessler, 1992; Bureau i Wessler, 1994; Bureau i sur., 1996), dugi od 200 pb do 500 pb, bez kodirajućih sljedova i završavaju s obrnutim ponavljanjima. Barem devet porodica elemenata MITE nalazi se u genomu riže i to obično u područjima koja sadrže gene.

**Retropozoni** ili **retrotranspozoni** su oblik pokretnih genetičkih elemenata koji podrazumijevaju RNA oblik kao međuproizvod tijekom životnog ciklusa. Jedinostveni su eukariotima i najjednostavniji takvi elementi ne posjeduju sami po sebi transpozicijsku aktivnost, ali imaju sljedove koje aktivni elementi mogu prepoznati kao supstrat za transpoziciju. Elementi koji koriste RNA-ovisnu transpoziciju obuhvaćaju retroviruse (koji mogu slobodno inficirati domaćinske stanice i ugrađivati svoje genome /provirus/ u kromosome domaćina), sljedove koji se pokreću unutar genoma preko RNA međuproizvoda i sljedove koji nemaju mogućnost samostalnog pokretanja. Prisutnost ovih elemenata u genomima eukariota vidljiva je po kratkim izravnim ponavljanjima koja ostaju na mjestima ugradnje, bilo kao ostatak davne ili recentnije aktivnosti. Retropozoni se mogu podijeliti u tri osnovne skupine:

- **Virusna superporodica** – njeni članovi kodiraju za reverznu transkriptazu (RT) i/ili integrazu i razmnožavaju se na isti način kao i retrovirusi. Najbolje opisani primjeri su **Ty** i **Copia** elementi kod kvasca i vinske mušice. Od retrovirusa se razlikuju po tome što ne prolaze infektivni ciklus. Još se nazivaju i **LTR retrotranspozoni** zbog prisutnosti dugih ponavljanja na krajevima elementa (eng. Long Terminal Repeats - LTR).
- **LINE** (eng. Long Interspersed Nuclear Elements) – također ih karakterizira aktivnost reverzne transkriptaze, no nedostaju im LTR-ovi i koriste drugačiji mehanizam za početak reverzne transkripcije u odnosu na retroviruse. Nastaju aktivnošću RNA polimeraze II. Manji dio ovih elemenata je potpuno funkcionalan i može se pokretati samostalno dok drugi zbog nakupljenih mutacija mogu jedino biti pokrenuti djelovanjem *trans*-djelujućeg samostalnog elementa. Učestali oblici su L1 (kod ljudi), B1, B2, ID, B4 (kod miša).
- **Ne-virusna superporodica** – potekli su od RNA slijedova, no ne zna se kako je nastala DNA kopija. Pretpostavlja se da su bili meta transpozicije od strane enzimatskog sustava koji je bio drugdje kodiran te su stoga nesamostalni elementi nastali iz staničnih transkripata. Dakle, oni ne kodiraju za proteine koji im mogu omogućiti pokretanje u genomu. Najistaknutiji član ove obitelji su elementi **SINE** (eng. Short Interspersed Nuclear Elements). Ovi elementi nastaju kao posljedica transkripcije RNA polimeraze III.

### 1.3. Retrovirusi i LTR retrotranspozoni

Genom retrovirusa je jednolančana RNA koja se replicira preko dvolančanog DNA međuproizvoda. Životni ciklus virusa obuhvaća stadij u kojem se dvolančana DNA ugrađuje u genom domaćina u događaju nalik na transpoziciju i stvara kratke sljedove izravnih ponavljanja. Ostale posljedice ove reakcije su: (i) retrovirusni slijed nakon ugradnje u zametnu lozu ostaje u staničnom genomu kao endogeni provirus i ponaša se kao dio genetičkog materijala organizma; (ii) stanični sljedovi povremeno rekombiniraju s retrovirusnim sljedovima i zatim se pokreću s njima unutar genoma i (iii) stanični sljedovi koje prenosi retrovirus mogu promijeniti značajke stanice zaražene virusom. Enzim koji stvara prvotnu DNA kopiju na kalupu RNA genoma virusa je reverzna transkriptaza (RT). Ona pretvara RNA u linearnu dvolančanu DNA u citoplazmi

zaražene stanice. Linearnost dvolančane DNA nije nužna već ona može poprimiti i kružni oblik ali takva nije uključena u proces umnažanja. Linearna DNA odlazi u jezgru gdje se jedna ili više kopija ugrađuje u genom domaćina. Enzim integraza odgovoran je za ugradnju. Provirus se prepisuje korištenjem stanične mašinerije i stvara se virusna RNA, koja služi kao mRNA i kao genom za pakiranje u virusne čestice. Dvije kopije virusnog genoma upakiraju se u svaku zaraznu česticu (virion) te je na taj način svaka virusna čestica diploidna.

Tipičan retrovirusni slijed obuhvaća tri do četiri kodirajuća područja (otvoreni okviri čitanja), najčešće organiziranih kao slijed *gag-pol-env*. Retrovirusna mRNA ima uobičajeni oblik, 5' kapu i 3' poliA rep. Prvo se stvara mRNA iz koje nastaju *gag* i *pol* transkripti. Izrezivanjem nastaje manja subgenomska mRNA koja se translatira u *env* proizvod. Iz *gag* regije nastaju proteini koji izgrađuju nukleoproteinsku srž virionske čestice, dok *pol* regija kodira za proteine uključene u stvaranje nukleinskih kiselina i rekombinaciju, a *env* regija kodira za sastavne dijelove ovojnice. Proizvodi *gag*, *gag-pol* i *env* su poliproteini koje cijepa proteaza i oslobađa pojedinačne sastavnice. Retrovirusi su plus lančani virusi jer virusna RNA sama kodira za proteinske proizvode. *Reverzna transkriptaza* (RT) prepisuje ovaj plus lanac RNA u komplementarni minus lanac DNA. Reverzna transkriptaza ima i ribonukleaznu aktivnost za koju je odgovorna ribonukleaza H (RNaze H) uz pomoć koje dolazi do uklanjanja RNA iz hibrida RNA-DNA, te DNA polimeraznu aktivnost kojom dolazi do stvaranja komplementarnog plus lanca DNA. Virusna RNA na svojim krajevima ima izravna ponavljanja koja se zovu *R odsječci* (10-80 nukleotida). Na 5' kraju nalazi se R-U5, a na 3' kraju R-U3. Početnica za reverznu transkripciju je domaćinska tRNA bez vezane aminokiseline, koja se veže na 5' kraj virusne RNA i odatle kreće stvaranje DNA. Tijekom tog procesa RT mijenja kalupe, noseći sa sobom novostvorenu DNA do novog kalupnog mjesta. Dijelovi RNA bivaju istovremeno uklanjani aktivnošću Rnaze H. Ta prebacivanja između kalupa i produljivanja lanaca malo s jedne pa malo s druge strane uzrokuje u konačnici stvaranje LTR slijedova prilikom čega nastaju 250 do 1400 pb dugi krajevi na 5' i 3' kraju koji se ne prevode u aminokuselinski slijed. Svaka virusna čestica nosi sa sobom dvije RNA molekule pa je tijekom životnog ciklusa virusa moguća rekombinacija upravo tijekom prebacivanja enzima RT s jednog kalupa na drugi i taj mehanizam se zove „*copy choice*“. Virusni enzim integraza odgovoran je za ugradnju provirusa u genom domaćina. Krajevi virusne DNA bitni su jer, na primjer, mutacije u krajevima transpozona sprječavaju ugradnju u genom domaćina. Najočuvanije obilježje je dvonukleotidni slijed CA blizu krajeva svakog od

obrnutih ponavljanja. Integraza dovodi krajeve linearne DNA zajedno u riboproteinski kompleks, te zatim obrađuje tupe krajeve tako da im ukloni sve parove baza poslije očuvanog CA slijeda. Mjesto ugradnje bira se nasumično obzirom na slijed nukleotida u virusnoj DNA. U inficiranu stanicu ugradi se 1 do 10 provirusa.

Poput retrovirusa, retroelementi koji sadrže ponavljanja LTR dijele se s obzirom na broj neovisnih okvira čitanja za *gag*, *pol* i *int* (pokretni retroelementi najčešće nemaju *env* područje ili im je nefunkcionalno), te s obzirom na poredak gena za reverznu transkriptazu, RnazuH i integrazu. Elementi koji sadrže LTR-ove obuhvaćaju integrirane retroviruse i retropozone koji su izgubili mogućnost stvaranja infektivnih čestica. Elementi iz kvasca i vinske mušice obuhvaćaju Ty i copia vrste elemenata koji ne mogu stvarati infektivne čestice. Za razliku od spomenutih vrsta mišji genom ima nekoliko aktivnih endogenih retrovirusa koji mogu stvarati virusne čestice i rasprostranjivati se horizontalnom infekcijom. Za usporedbu, svi su endogeni retrovirusi u ljudskoj lozi izgubili mogućnost infekcije prije 50 milijuna godina, te im genom sada sadrži samo neaktivne ostatke endogenih retrovirusa.

LTR retrotranspozoni dijele se na: retroviruse kralješnjaka (**Retroviridae**), **hepadnaviruse**, **caulimoviruse**, *Ty1/copia* (**Pseudoviridae**), *Ty3/gypsy* (**Metaviridae**), **BEL** i **DIRS1** skupine (Malik i Eickbush, 2001). Pseudoviridae imaju tri glavna roda; pseudovirusi, hemivirusi i sirevirusi. Pseudovirusi i hemivirusi razlikuju se u začetnici za reverznu transkripciju (cjelovita ili polovična tRNA), a sirevirusi imaju različit slijed u genu RT u odnosu na druga dva člana. Metaviridae se dalje dijele u 9 skupina obzirom na mješovite filogenetske analize domena za reverznu transkriptazu (RT), ribonukleazu H (RnaseH) i integrazu (INT). Oni se također svrstavaju u tri roda s obzirom na prisutnost (*Errantivirus*) ili odsutnost (*Metavirus*) gena *env*, te prisutnost kromodomene (kromointegraze) (*Chromovirus*) (Malik i Eickbush, 1999; Marin i Llorens, 2000). Upravo su kromovirusi najrasprostranjenija skupina unutar Metaviridae LTR retrotranspozona a prisutni su u biljakama, gljivama i kralješnjacima (Marin i Llorens, 2000). Kod biljaka i gljiva opisani su mnogi ovakvi elementi pune duljine, dok su kod kralješnjaka cjelovite kopije opisane kod riba *Takifugu rubripes* (Poulter i Butler, 1998) i *Hydromantes supramontis* (Maracci i sur., 1996). Kod većine riba, gmazova i vodozemaca uglavnom su prisutni kraći oblici (Miller i sur., 1999) kao i element Hur1 kod ljudi (Butler i sur., 2001). Kromovirusni elementi mogu sadržavati jedan ORF (otvoreni okvir čitanja), koji kodira

*gag/pol* poliprotein ili dva koji kodiraju odvojeno za *gag* i *pol*. Proteinski sljedovi *gag* pokazuju vrlo nizak stupanj evolucijske očuvanosti i znatno se razlikuju među članovima različitih porodica. *Pol* proteinski sljedovi znatno su očuvaniji, pogotovo RT/RnaseH domene. Mnogi elementi imaju strukturno očuvane ORF-ove i LTR-ove sa samo nekoliko stop kodona unutar okvira čitanja što upućuje na njihovu nedavnu transpozicijsku aktivnost. Većina biljnih LTR retrotranspozona sklona je ugrađivanju u razmjerno tihi kromatin, smješten posebice u pericentromernom području što smanjuje negativan selekcijski pritisak koji djeluje na pokretne elemente od strane domaćina (Kumar i Bennetzen, 1999).

#### 1.4. *Ty3/gypsy* ili *romani* skupina LTR retrotranspozona

Kod biljaka prisutni su pokretni elementi obiju skupina (skupine I i II). Ipak zastupljeniji su elementi skupine I, retrotranspozoni, čija količina u genomu iznosi od 15% kod vrste *Arabidopsis thaliana* te čak do 70-80% kod kukuruza i ječma. Smatra se da je aktivnost LTR retrotranspozona dovela do povećanja genoma kukuruza prije 5-6 milijuna godina (Feschotte i sur., 2002). Općenito, može se reći da je samo mali dio retrotranspozona aktivan u biljnim genomima (Feschotte i sur., 2002). Naime, dokazano je da između retroelemenata dolazi do rekombinacije uglavnom u području LTR-ova kao protuteža nakupljanju velike količine LTR retrotranspozona pri čemu u genomu ostaju samostalni LTR-ovi (Vitte i Panaud, 2003). Kod biljaka pronađeni su također LTR retrotranspozoni koji sadrže treći otvoreni okvir čitanja (ORF3) koji kodira za proteine omotača (gen *env*) i daje im svojstvo infektivnosti (Marco i Marín, 2005). Unutar skupine *Ty3/gypsy* takvi retroelementi su npr. *Athila* izolirani iz vrste *A. thaliana* (Wright i Voytas, 1998). Iako vrsta *A. thaliana* ima mali genom istraživanja su pokazala da u njenom genomu postoji čak 6 porodica ovih retroelemenata (Marín i Lloréns, 2000). Neke od njih su mali *athila* elementi jer nemaju ORF3, *athila* elementi *cyclops* koji posjeduju ORF3, te *diaspora* i *calypso* koji su nađeni i u genomima jednosupnica i dvosupnica. Glavna razlika između *Ty1/copia* i *Ty3/gypsy* je u razmještaju domena koje kodiraju za proteine. Kod retroelemenata *copia* taj je raspored LTR-gag-proteinaza-int-rt-LTR, a kod *gypsy* LTR-gag-proteinaza-rt-int-LTR. *Copia* tip retroelemenata su vrlo široko rasprostranjeni kod viših biljaka (barem njihove RT domene). Za biljne *Ty3/gypsy* elemente primjenjuje se i naziv *romani* kako bi se napravila razlika od kvasvca po kojem je ta skupina dobila naziv *gypsy*, te kako bi se zornije

ukazalo na njihovu doista veliku pojavnost i široku rasprostranjenost (Suoniemi i sur. 1998). Smatra se da su se ti retroelementi najvjerojatnije širili vertikalnim prijenosom vrlo rano u evoluciji eukariota te su danas široko rasprostranjeni u biljnim genomima. Većina *Ty3/gypsy* retroelemenata danas je neaktivna iako su očuvane kopije opisane kod nekih biljnih vrsta i mahovina (Novikova i sur. 2008). Prva aktivna kopija elementa *Ty3/gypsy*, LORE1, otkrivena je 2005. godine u vrsti *Lotus japonicus* (Madsen i sur., 2005).

#### 1.5. Organizacija ponavljajuće DNA u rodu *Anemone*

Evolucija genoma u biljaka praćena je poliploidijom, aneuploidijom i kromosomskim preslagivanjima (Cui i sur., 2006; Weiss-Schneeweiss i sur., 2007; Leitch i Leitch, 2008). Pojava tih promjena u genomu usko je povezana s ponavljajućim sljedovima DNA u genomu posebice pokretnim genetičkim elementima. Naime, poznato je da stresni uvjeti najčešće uzrokuju aktivaciju retrotranspozona (Hirochika i sur. 1996). Stoga se u praćenje evolucije genoma ne koriste samo genski biljezi kao što su npr. geni za 35S i 5S rRNA i heterokromatinska odnosno područja satelitskih DNA već i retroelementi (Besendorfer i sur., 2005, Mlinarec i sur. 2006, 2009; ref.).

Odličan sustav za proučavanje mehanizama evolucije biljaka na molekularnoj i kromosomskoj razini je kompleks *Anemone* koji se sastoji od 70-90 vrsta povezanih u 7 rodova (Ulbrich, 1905-1906). *Anemone* su kozmopolitski vrste i nalaze se na svim kontinentima osim na Antarktici, gdje su također mogle obitavati u davnoj prošlosti kada je klima bila blaža. Zbog široko rasprostranjenih staništa i velike raznolikosti u morfologiji ova skupina jedna je od najinteresantnijih unutar porodice Ranunculaceae. U svrhu pojašnjavanja odnosa između vrsta u kompleksu *Anemone* od velike važnosti je proučavanje evolucije genoma na molekularnoj razini. Upotrebom molekularnih biljega Schuettpelz i sur. (2002) predložili su da se razdvajanje vrsta unutar ovog kompleksa dogodilo prije otprilike 100 milijuna godina na prijelazu iz srednje u kasnu kredu te da je središte širenja anemona bilo područje Sredozemlja. Osim navedenog, genomi vrsta u rodu *Anemone* spadaju među najveće unutar porodice *Ranunculaceae* (veličina genoma vrste *Anemone blanda* je  $1,3 \times 10^{10}$  pb po 1C) (Rothfels i sur. 1966). Između vrsta koje pripadaju spomenutoj porodici utvrđene su čak više nego dvostruke razlike u veličini jezgrine

DNA. Taj fenomen objašnjava se razlikom u broju kromosoma i količini ponavljajućih DNA koja između vrsta varira od 1% do preko 20%. Prijašnja istraživanja rađena na mediteranskoj vrsti *Anemone blanda* i drugim vrstama roda *Anemone* pokazala su da između 53% i 67% ukupne genomske DNA otpada na ponavljajuće sekvence (Cullis i Schweizer 1974). U vrsti *A. blanda* dvije skupine ponavljajućih sekvenci zauzimaju manje od 3% genoma što ukazuje da u genomu postoje mnoge druge porodice ponavljajućih elemenata koje još nisu okarakterizirane (Hagemann i sur. 1993). Uz porodicu uzastopno ponavljajućih sljedova u spomenutoj vrsti opisana je i porodica raspršene ponavljajuće DNA koja je opisana kao dio retroelementa *dorf-1* čija prisutnost je utvrđena i kod drugih vrsta roda *Anemone* što ukazuje na zajedničko porijeklo elementa *dorf-1*.

Vrsta *Anemone hortensis* L., široko je rasprostranjena duž jadranske obale i otoka. Obzirom na sredozemno porijeklo i činjenicu da su dosadašnja istraživanja pokazala prisutnost velike količine heterokromatina, te s njim povezanih satelitskih DNA u genomu (Mlinarec i sur., 2006, 2009), vrsta *A. hortensis* pokazala se kao dobar je model za proučavanje evolucijskih događaja uključenih u specijaciju na temelju brzo evoluirajućih ponavljajućih DNA. Na ovoj vrsti opisane su tri vrste porodica ponavljajuće DNA od kojih su dvije satelitske porodice smještene interkalarno (AhTR1) i subtelomerno (AhTR2), a treća je raspršena po svim kromosomima (AhDR). Upravo ta raspršena organiziracija ponavljajuće porodice AhDR ukazala je da bi se moglo raditi o retrotroelementu što je i pokazano na temelju primarnog nukleotidnog slijeda koji je djelomično sličan sa skupinom *Ty3/gypsy* retroelemenata (Mlinarec i sur., 2009).

## 2. Cilj istraživanja

Prethodnim istraživanjima značajki i organizacije genoma vrste *A. hortensis* utvrđene su dvije porodice uzastopno ponavljajućih DNA, AhTR1 i AhTR2, i jedna porodica raspršene ponavljajuće DNA, AhDR, koje čine otprilike 10% genoma vrste *A. hortensis* (Mlinarec i sur. 2009). Pretragom u genskoj bazi podataka utvrđeno je da AhDR porodica duljine slijeda od 945 pb ima dijelove koji odgovaraju *Ty3/gypsy* skupini LTR retrotranspozona. Cilj ovoga rada bio je: (i) detaljnije istražiti značajke porodice AhDR, (ii) utvrditi da li je porodica AhDR dio retrotranspozona i (iii) utvrditi značajke retrotranspozona i njegovu srodnost s već poznatim porodicama LTR retrotranspozona.



### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijal

U radu su korištene 2 vrste anemona, *Anemone hortensis* L. i *A. nemorosa* L. Obje vrste rastu u Botaničkom vrtu Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. Za izolaciju ukupne genomske DNA korišteni su svježii listovi ili listovi pohranjeni na -80°C.

##### 3.1.1. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

Agar (*Kemika*, Hrvatska), agarozna (*Sigma*, Njemačka), AgNO<sub>3</sub> (*Sigma*, Njemačka), amonijev-acetat (*Kemika*, Hrvatska), ampicilin (*Sigma*, Njemačka), baktotripton (*Becton, Dickinson & Co.*, SAD), BSA (*Sigma*, Njemačka), D-glukoza (*Kemika*, Hrvatska), EDTA (*Kemika*, Hrvatska), ekstrakt kvasca (*Sigma*, Njemačka), etanol (*Kemika*, Hrvatska), etidijev-bromid (*Sigma*, Njemačka), HCl (*Kemika*, Hrvatska), IPTG (*Sigma*, Njemačka), izopropanol ili 2-propanol (*Kemika*, Hrvatska), KCl (*Kemika*, Hrvatska), MgCl<sub>2</sub> (*Kemika*, Hrvatska), MgSO<sub>4</sub> (*Kemika*, Hrvatska), NaCl (*Kemika*, Hrvatska), NaOH (*Kemika*, Hrvatska), octena kiselina (*Kemika*, Hrvatska), SYBR Green (*Sigma*, Njemačka), Tris-HCl (*Kemika*, Hrvatska), X-Gal (*Fermentas*, Njemačka).

##### 3.1.2. Enzimi i komercijalni pripravci

U radu su korišteni sljedeći enzimi i komercijalni pripravci:

InsTAclone™ PCR Cloning Kit, sadrži T4 DNA ligazu (*Fermentas*, Njemačka), pGEM®-T Easy Vector System II (*Promega*, SAD), sadrži T4 DNA ligazu, GoTaq® DNA Polymerase (*Promega*, SAD), deoksiribonukleozid trifosfati dATP, dGTP, dCTP i dTTP (*Fermentas*, Njemačka), Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (*Promega*,

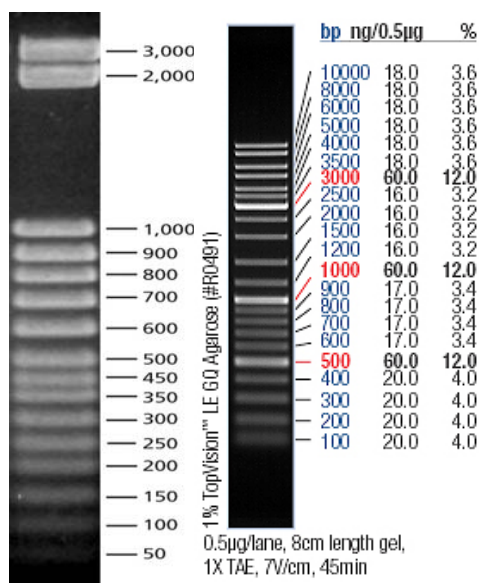
SAD), MEGAquick-spin<sup>TM</sup>PCR & Agarose Gel DNA Extraction Kit (*iNtRON*, Koreja), restriksijske endonukleaze *SalI* (*Fermentas*, Njemačka) i *KpnI* (*Fermentas*, Njemačka).

### 3.1.3. Početnice korištene za lančanu reakciju polimerazom (PCR)

Za umnažanje retrotranspozonskog slijeda koristio sam par degeneriranih početnice specifične za gene koji kodiraju za reverznu transkriptazu (RT) i integrazu (INT) unutar *pol* regije *Gypsy* porodice retrotranspozona: vbFor (rt) 5'-(CTGGTTCGGCCCA) GTITAWYKTIGAYGAYRTIYTIRT-3' i vbRev (int) 5'-(CTCGCTCGCCCA) ICKYTCISWYTGICRRTCISTYTGIGG-3' (Suoniemi i sur. 1998).

### 3.1.4. Biljezi molekularne mase

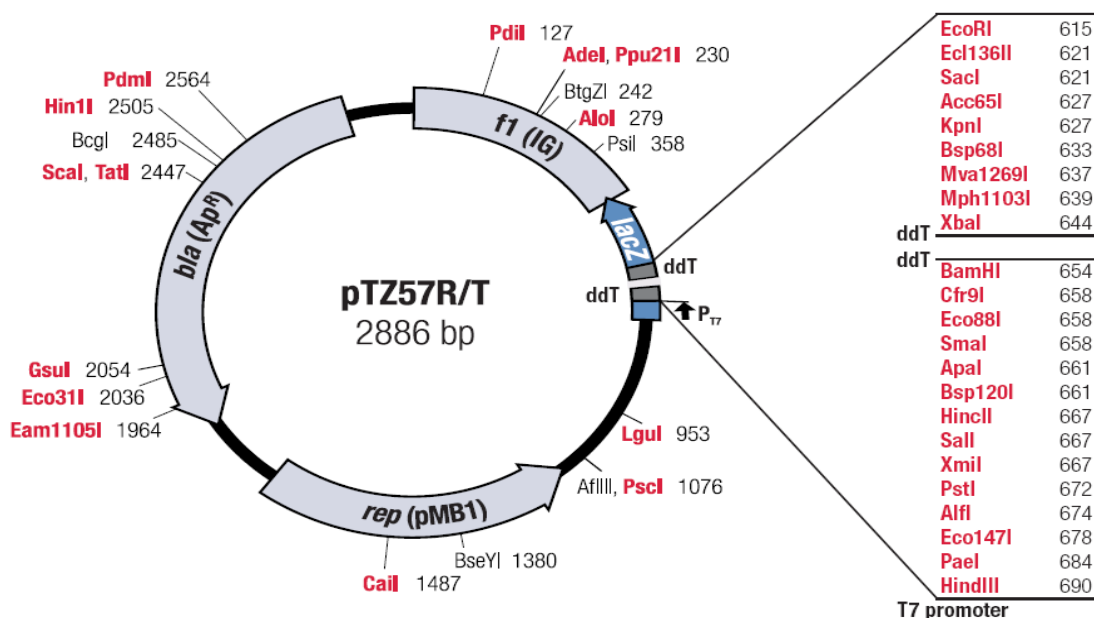
U svrhu određivanja duljine fragmenata DNA u 1% agaroznom gelu koristio sam biljege molekularne mase Step ladder, 50 bp (*Sigma*, Njemačka) i O'GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix (*Fermentas*, Njemačka) (sl. 1).



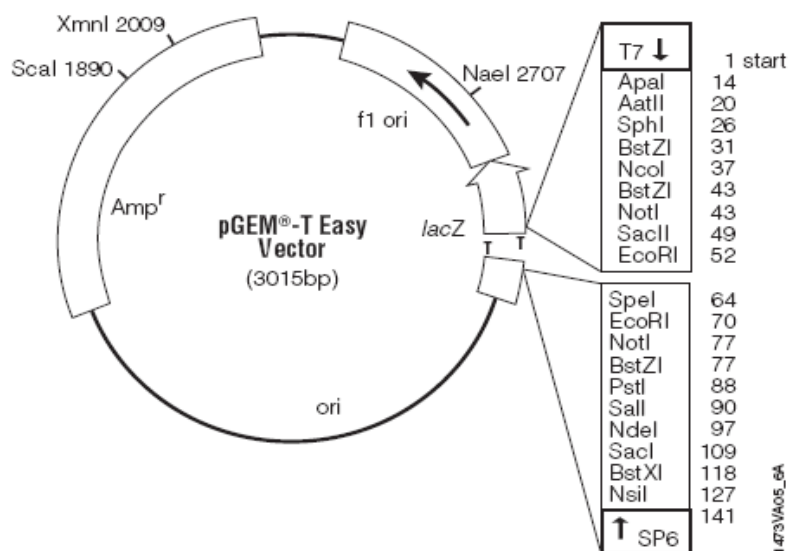
**Slika 1.** Biljezi molekularne mase Step Ladder, 50 bp i O'GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix.

### 3.1.5. Plazmidi

Za kloniranje umnoženih odsječaka u lančanoj reakciji polimerazom koristio sam plazmidni vektor pTZ57R/T (*Fermentas*, Njemačka) koji je lineariziran s 3'-dT krajevima koji sprječavaju ponovnu cirkularizaciju i pogodni su za izravno kloniranje PCR odsječaka sa stršećim 3'-dA krajevima koji su posljedica aktivnosti Taq polimeraze (sl. 2). Selekciju klonova s ugrađenim PCR odsječcima radio sam na temelju plavo-bijele selekcije. Selekcija se temelji na ugradnji odsječaka u gensko područje za  $\alpha$  podjedinicu enzima  $\beta$ -galaktozidaze što dovodi do inaktivacije gena i izostanka razgradnje X-Gal-a (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid) u hranidbenoj podlozi što se očituje pojavom bijelih bakterijskih kolonija. Ako je ugradnja odsječaka izostala dolazi do recirkularizacije plazmida i aktivacije gena za enzima  $\beta$ -galaktozidazu, te cijepanja X-Gal-a u hranidbenoj podlozi što se očituje plavim obojenjem bakterijskih kolonija. Kao induktor u hranjivu podlogu se dodaje IPTG (izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozid). Također sam koristio i plazmidni vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (*Promega*, SAD) (sl. 3), a selekciju sam radio prema gore navedenom protokolu.



**Slika 2.** Plazmidni vektor pTZ57R/T.



**Slika 3.** Plazmidni vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy.

### 3.1.6. Bakterijski sojevi

Elektrokompetentan bakterijski soj *Escherichia coli* XL1-blue koristio sam za transformaciju elektroporacijom i umnažanje plazmidnog vektora. Kemijski kompetentan bakterijski soj *Escherichia coli* JM109 koristio sam za transformaciju temperaturnim šokom. Kemijski kompetentne stanice JM109 priređene su prema izvornoj Inoue metodi za pripremu ultra-kompetentnih stanica (protokol za pripremu opisan u odjeljku 3.2.4.), dok su elektrokompetentne stanice XL1-blue pripremljene prema modificiranom protokolu (protokol za pripremu opisan u odjeljku 3.2.3.).

### 3.1.7. Hranidbene podloge za uzgoj i rast bakterijskih sojeva

Bakterijske sojeve, prethodno transformirane plazmidnim vektorom s ugrađenim PCR odsječkom, uzgajao sam na LB hranidbenim podlogama (pH 7-7,7) koje su se sastojale od 10

g/L baktotriptonu, 5 g/L kvašćevog ekstrakta i 10 g/L NaCl-a. Krute podloge pripremao sam dodatkom 15 g/L agara. Podloge sam sterilizirao 18 minuta na temperaturi od 120°C i tlaku od 1,5 bara. Za plavo-bijelu selekciju koristio sam podloge u koje sam dodao ampicilin u konačnoj koncentraciji 100 mg/mL, te na njih nanosio 10 µL IPTG-a i 30 µL X-Gal-a. U istu svrhu koristio sam i hranidbenu podlogu 2TY koja je sadržavala 16 g/L baktotriptonu, 10 g/L kvašćevog ekstrakta i 5 g/L NaCl-a. Za oporavak bakterija nakon elektroporacije koristio sam tekuću podlogu LB, a za oporavak nakon temperaturnog šoka tekuću podlogu SOC koja se sastoji od 2%-tnog baktotriptonu, 0,5%-tnog kvašćevog ekstrakta, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukoze, 10 mM NaCl i 2,5 mM KCl.

### 3.1.8. Tehnička oprema

U radu sam koristio sljedeće uređaje:

1. Centrifuga mini spin (*Eppendorf*, Njemačka), stolna centrifuga 5415D (*Eppendorf*, Njemačka)
2. Elektroporator MicroPulser (*Bio-Rad*, SAD) i kivete za elektroporaciju (*Bio-Rad*, SAD)
3. Inkubator (*Termomedicinski aparati*, Hrvatska), inkubator s tresilicom (*NewBrunswick Scientific*, SAD)
4. Termomikser COMFORT (*Eppendorf*, Njemačka)
5. Spektrofotometar UV/VIS (*Unicam*, SAD)
6. Stolna tamna komora s UV lampom (*UVITEC*) i digitalnom kamerom EDAS (*KODAK*)
7. Vodena kupelj s tresilicom (*Polytest 30*)
8. Uređaj za elektroforezu: Wide Mini-Sub Cell i GT Cell, PowerPac Basic power supply (*Bio-Rad*, SAD)
9. Uređaj za PCR (*Applied Biosystems*, SAD)
10. Pipete: Proline® i mLINER® (*Biohit*, Finska); Eppendorf Research® Adjustable-volume (*Eppendorf*, Njemačka)
11. Tube i nastavci za pipete (*Eppendorf*, Njemačka)

12. Računalni programi: ClustalX, BioEdit, GeneDoc, MEGA 4.0 te programe dostupne na internetskim stranica [www.expasy.org](http://www.expasy.org) i [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Izolacija genomske DNA i umnažanje DNA odsječaka pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR)

Izolaciju ukupne genomske DNA izveo sam prema protokolu koji su opisali Saghai-Marooif i sur. (1984.). Za umnažanje retrotranspozonskog slijeda RT-INT u vrstama roda *Anemone* koristio sam degenerirane oligonukleotidne početnice vbFor i vbRev prema Suoniemi i sur. (1998). Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom (PCR) sadržavala je sastojke u konačnim koncentracijama navedenim u Tablici 1.

**Tablica 1.** Sastojci i njihova konačna koncentracija u PCR-mješavini.

Sastojak	Konačni volumen	Konačna koncentracija
5X Green ili Colorless GoTaq® Reakcijski pufer	10 µL	1X (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
dNTP Mix, 10mM svaki	1 µL	0.2mM svaki dNTP
vbFor	1 µL	0.1–1.0µM
vbRev	1 µL	0.1–1.0µM
GoTaq® DNA polimeraza (5u/µl)	0,25 µL	1.25u
DNA (uzorak)	1 µL	<0.5µg/50µl
diH <sub>2</sub> O do ukupnog volumena	<b>50 µL</b>	

Odsječci RT-INT u vrsti *Anemone nemorosa* umnažani su prema protokolu za „touchdown“-PCR koji su za istu vrstu koristili Suoniemi i sur. (1998). Opis programa prikazan je u Tablici 2.

**Tablica 2.** Protokol za „touchdown“-PCR korišten za umnažanje odsječaka RT-INT u vrsti *A. nemorosa*.

Reakcija	Temperatura	Vrijeme
<b>Denaturacija kalupa</b>	94°C	3 min
<b>Denaturacija</b>	94°C	30 s
<b>Vežanje početnica</b>	50°C*	30 s
	72°C	3 min
<b>Produljivanje lanaca</b>		
<b>Denaturacija kalupa</b>	94°C	30 s
	56°C	30 s
	72°C	3 min
<b>Vežanje početnica</b>		
<b>Produljivanje lanaca</b>		
<b>Završno produljivanje lanaca</b>	72°C	10 min
<b>Završno čuvanje uzoraka</b>	4°C	∞

\*na ovom koraku se temperatura reakcijske smjese spuštala za 1,5°C u sljedećim ciklusima („ramping“)

**Tablica 3.** PCR protokol za umnažanje odsječaka RT-INT u vrsti *A. hortensis*.

Reakcija	Temperatura	Vrijeme
<b>Denaturacija kalupa</b>	94°C	3 min
<b>Denaturacija</b>	94°C	30 s
<b>Vežanja početnica</b>	50°C	30 s
	72°C	3 min
<b>Produljivanje lanaca</b>		
<b>Denaturacija kalupa</b>	94°C	30 s
	56°C	30 s
	72°C	3 min
<b>Vežanje početnica</b>		
<b>Produljivanje lanaca</b>		
<b>Završno produljivanje lanaca</b>	72°C	10 min
<b>Završno čuvanje uzoraka</b>	4°C	∞



Za umnažanje odsječaka RT-INT u vrsti *A. hortensis* nije korišten „touchdown“-PCR već se reakcija odvijala prema protokolu opisanom u Tablici 3.

### 3.2.2. Kloniranje odsječaka dobivenih PCR-om

Odsječke RT-INT umnožene pomoću lančane reakcije polimerazom razdvojio sam gel-elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu pripremljenom u 1xTAE puferu s dodatkom etidij bromida i konstantnom strujnom polju od 80V. Uspješnost umnažanja provjeravao sam koristeći UV-svjetlo. Umnožene odsječke duljine 2 Kb izrezaao sam iz gela i pročistio uz pomoć komercijalnog proizvoda “PCR & Agarose Gel DNA Extraction Kit”. Pročišćene odsječke klonirao sam u vektor pTZ57R/T koristeći pripravak “InsTAclone™ PCR Cloning Kit”. Ligacijsku smjesu opisanu u Tablici 4 ostavio sam u uređaju za PCR preko noći na 22°C. Odsječke RT-INT umnožene pomoću lančane reakcije polimerazom također sam razdvojio gel-elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu pripremljenom u 1xTAE puferu s dodatkom Sybr Green pripravka za vizualizaciju nukleinskih kiselina.

**Tablica 4.** Ligacijska smjesa za ugradnju u vektor pTZ57R/T.

Sastojak	Volumen
Vektor pTZ57R/T, (0.18 pmol krajevi)	3 µl
5X Ligacijski pufer	6 µl
PCR odsječci (0.54 pmol krajevi)	Promijenljivo*
T4 DNA Ligaza	1 µl
H <sub>2</sub> O, oslobođena nukleaza	do 29 µl
<b>Ukupni volumen</b>	<b>30 µl</b>

Ligacijska smjesa za kloniranje u Plazmidni vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Tablica 5) razlikovala se od prethodno opisane, a ligacija se odvijala u uređaju za PCR preko noći na 14°C.

**Tablica 5.** Ligacijska smjesa za kloniranje u vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy.

Sastojak	Volumen
Vektor pGEM <sup>®</sup> -T Easy (50ng)	1 $\mu$ l
2X Rapid Ligacijski pufer	5 $\mu$ l
PCR proizvod *do 3 $\mu$ l PCR uzorka	Promijenljivo*
T4 DNA Ligaza (3u/ $\mu$ L)	1 $\mu$ l
<b>Ukupni volumen</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

### 3.2.3. Priprema elektrokompetentnih stanica

Bakterijski soj XL1-blue uzgajao sam u prekončnoj kulturi nakon čega sam 5 mL kulture dodao u 500 mL tekuće podloge LB i pohranio u inkubator s tresilicom (37°C, 200 rpm). Svakih pola sata mjerio sam optičku gustoću kako bih bio siguran da se bakterije nalaze u log fazi rasta kada im je optička gustoća 0,6-1,0 (0,8 je optimalna vrijednost) pri valnoj duljini svjetlosti od 600 nm. Bakterijske kulture optimalne gustoće stavio sam na led i istaložio stanice centrifugiranjem 6 min na 5000g u centrifugi Sorvall ohlađenoj na 4°C. Supernatant sam odlio i stanice resuspendirao u 100 mL ledene dH<sub>2</sub>O. Zatim sam ponovio centrifugiranje i ispiranje u istim uvjetima nakon čega je uslijedilo ispiranje u 30 mL ledene dH<sub>2</sub>O. Ponovio sam centrifugiranje u istim uvjetima, izlio supernatant u što većoj količini i prenio rahli talog u tubu od 1,5 mL te dodao 1,5 mL 7%-tnog DMSO. Sadržaj tube raspodijelio sam u nekoliko tuba u volumenu od 50  $\mu$ L te pohranio na -80°C.

### 3.2.4. Priprema kemijski kompetentnih bakterijskih stanica

Za pripremu kemijski kompetentnih stanica JM109 pripremio sam Inoue transformacijski pufer ohlađen na 0°C, koji se sastoji od 20 mL steriliziranog 0,5 M PIPES (piperazin-1,2-bis[2-etansulfonska kiselina], pH 6,7, 16,65 g KCl, 2,2 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10,88 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O i vode. Postavio sam prekončnu kulturu bakterijskih stanica JM109 u 25 mL tekuće LB hranjive podloge na 37°C s neprekidnom trešnjom od 300 rpm. 10 mL prekončne bakterijske kulture JM109 nacijepio sam u 250 mL tekućeg hranjivog medija SOB, te inkubirao preko noći na

temperaturi 18-22°C s trešnjom. Kada je slijedećeg dana optička gustoća stanica dosegla vrijednost 0,55 (pri  $\lambda=600$  nm) stanice sam prebacio 10 minuta u ledenu kupelj, te zatim centrifugirao 10 minuta na 2500g i 4°C. Odlio sam supernatant i lagano resuspendirao stanice u 80 mL ledeno hladnog Inoue transformacijskog pufera kružnim pokretima. Ponovno sam centrifugirao 10 minuta na 2500g i 4°C, te odlio supernatant i lagano resuspendirao stanice u 20 ml ledeno hladnog Inoue pufera. Dodao sam 1,5 ml DMSO, promiješao bakterijsku suspenziju kružnim pokretima, te pohranio 10 min u ledenoj kupelji. Nakon toga sam razdjelio stanice na alikvote u ohlađene, sterilne tube, te ih odmah zamrznuo u tekućem dušiku i pokranio na -80°C.

### 3.2.5. Transformacija elektroporacijom i temperaturnim šokom

Kod transformacije bakterijskih stanica elektroporacijom u smjesu od 50  $\mu$ L elektrokompetentnih stanica *E. coli* soja XL1-blue dodao sam 4  $\mu$ L ligacijske smjese s plazmidnim vektorom pTZ57R/T. Cijeli sadržaj tube sam promiješao i prebacio u kivetu za elektroporaciju te izložio strujnom pulsom od 1,8 KV u trajanju od 3 ms uz pomoć elektroporatora. U kivetu sam zatim brzo dodao 500  $\mu$ L hranidbene podloge LB ili 2TY, te cijeli sadržaj kivete prebacio u sterilnu tubu. Bakterije sam inkubirao 1h u inkubatoru s tresilicom (200 rpm) na 37°C.

Kod transformacije kemijski kompetentnih bakterijskih stanica u smjesu od 200  $\mu$ L kompetentnih stanica *E. coli* soja JM109 dodao sam 10  $\mu$ L ligacijske smjese s plazmidnim vektorom pGEM<sup>®</sup>-T Easy, te promiješao smjesu. Bakterije su inkubirane u vodenoj kupelji na 42°C točno 90s. Nakon toga su bakterije naglo ohlađene i inkubirane na ledu 1-2 min nakon čega sam dodao 800  $\mu$ L tekuće hranjive podloge SOC i ostavio 45 min u inkubatoru s tresilicom (ne više od 200 rpm) na 37°C.

Nakon transformacije bakterijskih stanica slijedilo je naciepljivanje na hranidbenu podlogu. Na prethodno izliveno ploče s krutom hranidbenom podlogom LB i ampicilinom (radne koncentracije 100 mg/mL) nanio sam 10 mL IPTG-a i 30  $\mu$ L X-Gal-a. Nakon sat vremena, kada su se IPTG i X-Gal upili u podlogu naciepio sam bakterijske stanice i inkubirao ih preko noći na 37°C. Na temelju plavo-bijele selekcije odabrao sam bakterijske kolonije koje su sadržavale plazmide s ugrađenim fragmentom. Bijele kolonije sam pomoću sterilnih štapića stavio u

eprovete s 3 mL tekuće podloge LB s ampicilinom (radna koncentracija 100 mg/mL) te ostavio preko noći u inkubatoru s tresilicom (200 rpm).

### 3.2.6. Izolacija plazmidne DNA i sekvenciranje

Iz prekončnih bakterijskih kultura izolirao sam plazmidnu DNA koristeći komercijalno dostupan pripravak “Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System”. Izoliranu, čistu, plazmidnu DNA s ugrađenim insertom pohranio sam na -20°C. Kako bih provjerio da li je došlo do ugradnje željenih odsječaka u plazmidnu DNA, plazmid sam pocijepao restrikcijским endonukleazama prema protokolu prikazanom u Tablici 6. Slijed nukleotida DNA odsječaka ugrađenih u plazmidnu DNA određen je u servisu Macrogen (Koreja).

**Tablica 6.** Cijepanje plazmidne DNA restrikcijским endonukleazama.

Sastojak	Volumen
Restrikcijiske endonukleaze <i>KpnI</i> i <i>Sall</i>	0,3 µl + 0,3 µl
Plazmidna DNA	3 µl
Pufer (orange) za restrikcijiske enzime	2 µl
H <sub>2</sub> O	14,4 µl
<b>Ukupni volumen</b>	<b>20 µl</b>

## 4. Rezultati

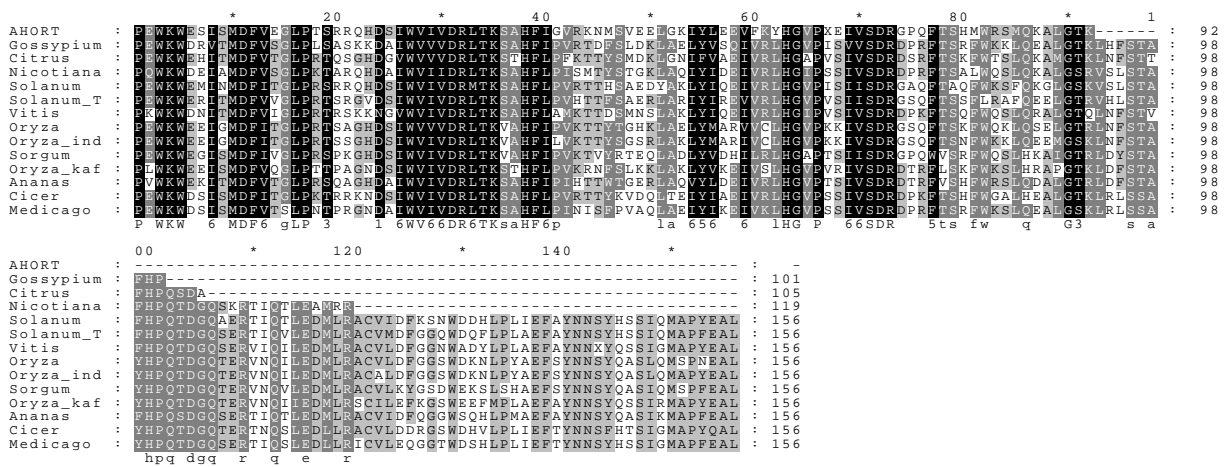
### 4.1. Značajke AhDR porodice ponavljajuće DNA iz vrste *Anemone hortensis*

Za utvrđivanje značajki porodice AhDR iz vrste *A. hortensis* upotrebljena je konsenzus sekvenca duljine 926 pb iz pet klonova dobivenih u prethodnim istraživanjima koje su proveli Mlinarec i sur. (2009). Klonovi AhDR i konsenzus nukleotidna sekvenca prevedeni su u aminokiselinski slijed upotrebom programa internetskog servisa ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) radi točnije pretrage u genskoj bazi podataka (sl. 4b). Dobiveni slijed od 308 aminokiselina (ak) iz konsenzus sekvence, koji nije imao niti jedan stop kodon u 5'-3' okviru čitanja 2, korišten je u daljnjim istraživanjima. Pretraga u BLAST-u ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) pokazala je da 92 ak smještene na C-terminalnom kraju (od 216.-308. ak) pokazuju veliku sličnost s dijelom gena za integrazu (INT), odnosno dijela superporodice rve (sl. 4a) karakteristične za retrotraspozone iz skupine *Ty3/gypsy*.



**Slika 4.** a) Grafički prikaz sličnosti aminokiselinskog slijeda porodice AhDR i dijela gena za integrazu (superporodica rve) i b) aminokiselinski sljedovi klonova AhDR i konsenzus slijeda s označenom sekvencom rve (uokvirenom plavo).

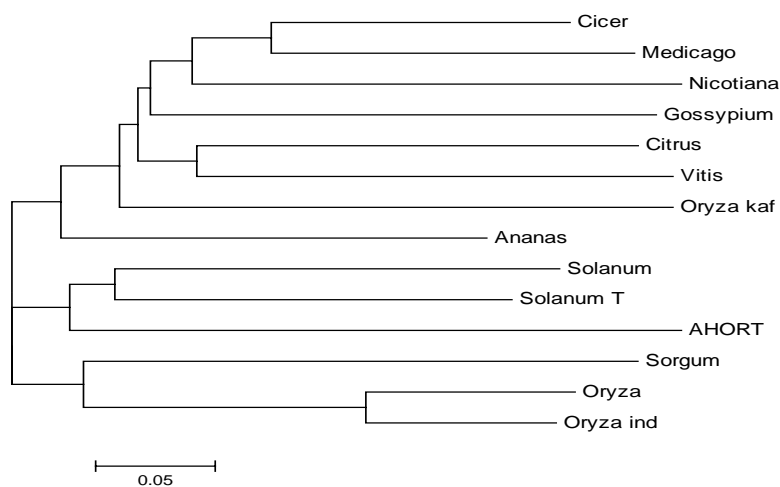
Slijed od 92 ak uspoređen je s najslbličnijim sljedovima koji kodiraju za integrazu u retrotraspozonima skupine *Ty3/gyppy* iz drugih biljnih vrsta. Svrnjenje aminokiselinskih sljedova pokazalo je da slijed od 92 ak iz porodice AhDR predstavlja nešto više od polovice aminokiselinskog slijeda za integrazu i da je dobro očuvan (54-64% identičnosti i 72-85% sličnosti) (sl. 5).



**Slika 5.** Usporedba superporodice rve porijeklom iz porodice AhDR izolirane iz vrste *A. hortensis* (AHORT) i drugih vrsta iz banke gena.

#### 4.2. Filogenetska analiza *Ty3/gyppy* retrotranspozona na temelju slijeda rve

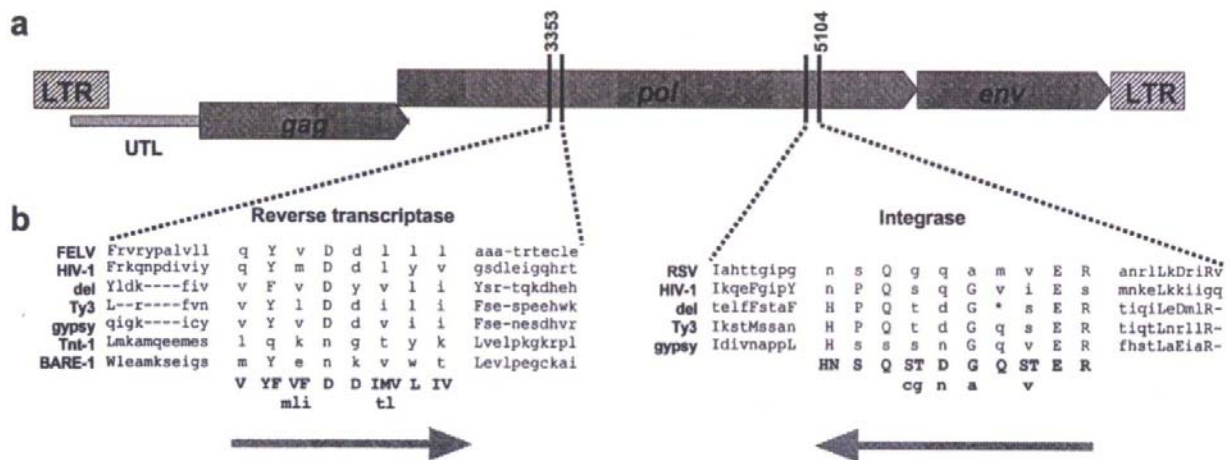
Slijed rve korišten je za filogenetsku analizu srodnosti porodice AhDR iz vrste *A. hortensis* s retrotranspozonima iz drugih vrsta čije su svrnjene sekvence prikazane na slici 5. Filogenetsko stablo dobiveno primjenom metode „Neighbor-joining“ (NJ) pokazalo je grupiranje porodice AhDR (AHORT) sa *Ty3/gyppy* retroelementima iz vrsta roda *Solanum* (sl. 6).



**Slika 6.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom „Neighbor-joining“ (NJ) na temelju sravnjenih sljedova superporodice rve iz 14 vrsta.

4.3. Umnažanje DNA između gena za reverznu transkriptazu (RT) i integrazu (INT) u vrstama *A. hortensis* i *A. nemorosa*

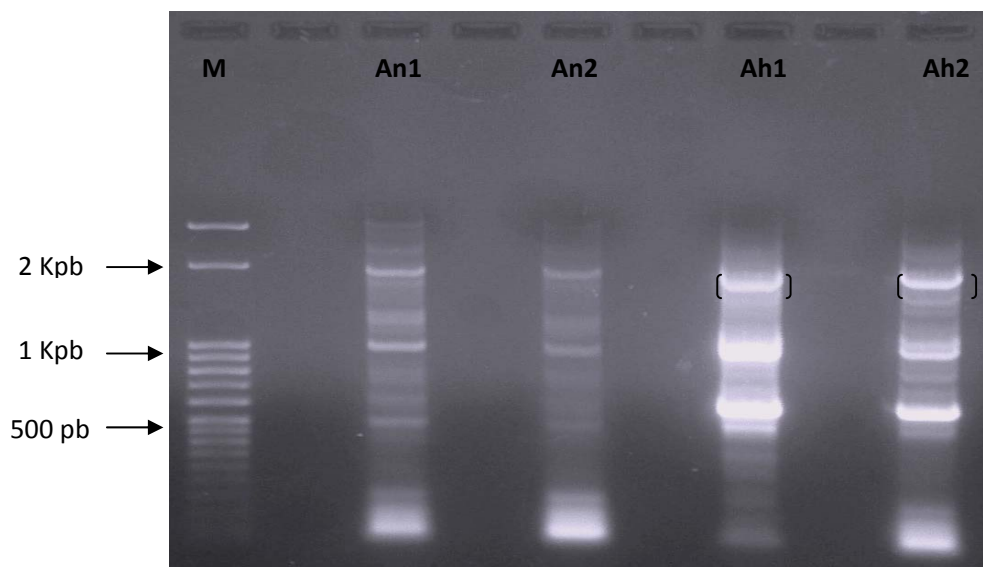
Sljedeći korak u istraživanju bio je utvrditi da li je porodica AhDR dio retrotranspozona. U tu svrhu korištene su degenerirane početnice vbFor (rt) u genu za reverznu transkriptazu (RT) i vbRev (int) u genu za integrazu (INT). Početnice su dizajnirane na temelju usporedne analize sekvenci iz različitih vrsta retrotranspozona i retrovirusa (sl. 7b) kako bi se umnožili dijelovi retrotranspozona koji pripadaju skupini *Ty3/gypsy* (sl. 7a) (Suoniemi i sur., 1998).



**Slika 7.** Shematski prikaz strukture LTR retrotranspozona s područjima unutar gena za reverznu transkriptazu (RT) i integrazu (INT) (a) i aminokiselinski sljedovi različitih vrsta retrotranspozona i retrovirusa (b) koji su korištena za izradu degeneriranih početnica za umnažanje *Ty3/gypsy* LTR retrotranspozona. Preuzeto iz Suoniemi i sur. (1998).

U ovaj dio istraživanja uključena je i vrsta *A. nemorosa* kod koje su Suoniemi sur. (1998), koristeći iste početnice, dobili umnožene odsječke DNA duljine od 1600, 1100 i 800 pb upotrebom „touchdown“ PCR-a. Za umnažanje RT-INT područja retrotranspozona u vrstama *A. hortensis* i *A. nemorosa* u ovom radu također je korišten „touchdown“ PCR. Ovom metodom umnažanja dobiveni su odsječci veličine oko 500, 1000 i 2000 pb samo kod vrste *A. nemorosa* (sl. 8; An1 i An2). U vrsti *A. hortensis* umnoženi odsječci istih duljina dobiveni su kada je korišten sličan PCR protokol ali bez snižavanja temperature vezanja početnica kroz 7 ciklusa (sl. 8; Ah1 i Ah2). S obzirom na duljinu odsječaka koje su Suoniemi i sur. (1998) opisali za vrstu *A. nemorosa*, te dobivenih PCR produkata u ovom radu, za kloniranje su izabrani odsječci duljine 2000 pb iz vrste *A. hortensis* (sl. x). Dobivena su dva klon kod kojih su ugrađeni PCR odsječci detaljnije analizirani.

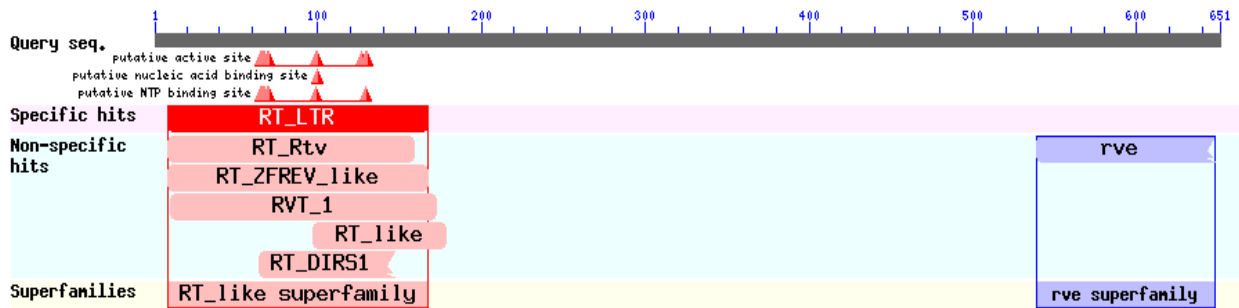




**Slika 8.** Gel elektroforeza u 1%-tnom agaroznom gelu. **M** je biljeg molekularne mase, **An1 i An2** su PCR-om umnoženi odsječki iz vrste *A. nemorosa* i **Ah1 i Ah2** iz vrste *A. hortensis*. Uglatim zagradama označeni su odsječki duljine 2000 pb koji su pročišćeni iz gela, uklonirani u plazmidni vektor i sekvencirani.

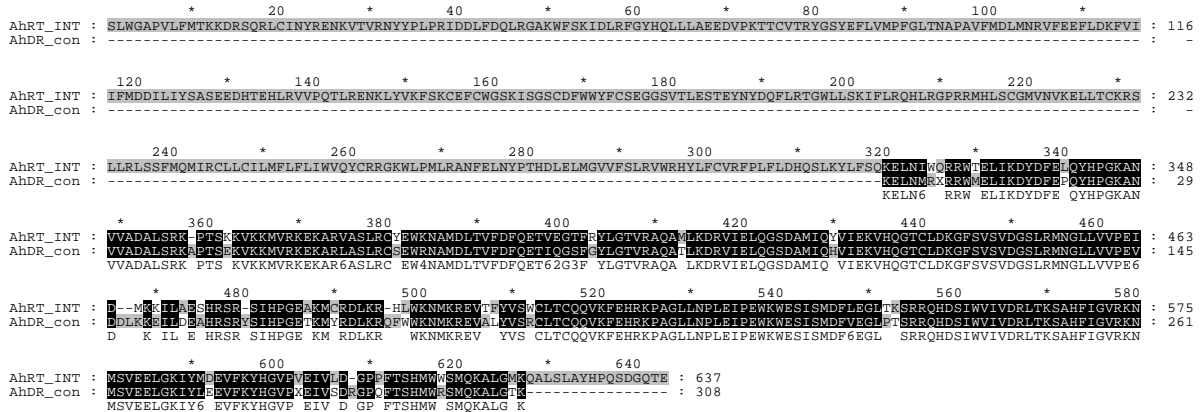
#### 4.4. Analiza sljedova DNA u području između gena za reverznu transkriptazu i integrazu

Od dva klona samo je jedan, klon AhRT\_INT s ugrađenim fragmentom duljine 2020 pb i aminokiselinskim slijedom od 637 ak, nakon pretraživanja u banki gena (pretraga BLAST) pokazao da sadrži dijelove reverzne transkriptaze i integraze (sl. 9).



**Slika 9.** Grafički prikaz sličnosti aminokiselinskog slijeda klona AhRT\_INT iz vrste *A. hortensis* u području za reverznu transkriptazu (RT) i integrazu (superporodica rve).

Usporedna analiza sljedova porodice AhDR i klona AhRT\_INT pokazala je da se porodica AhDR nalazi u dijelu retrotranspozona umnoženog degeneriranim početnicama za reverznu transkriptazu i integrazu (sl. 10).

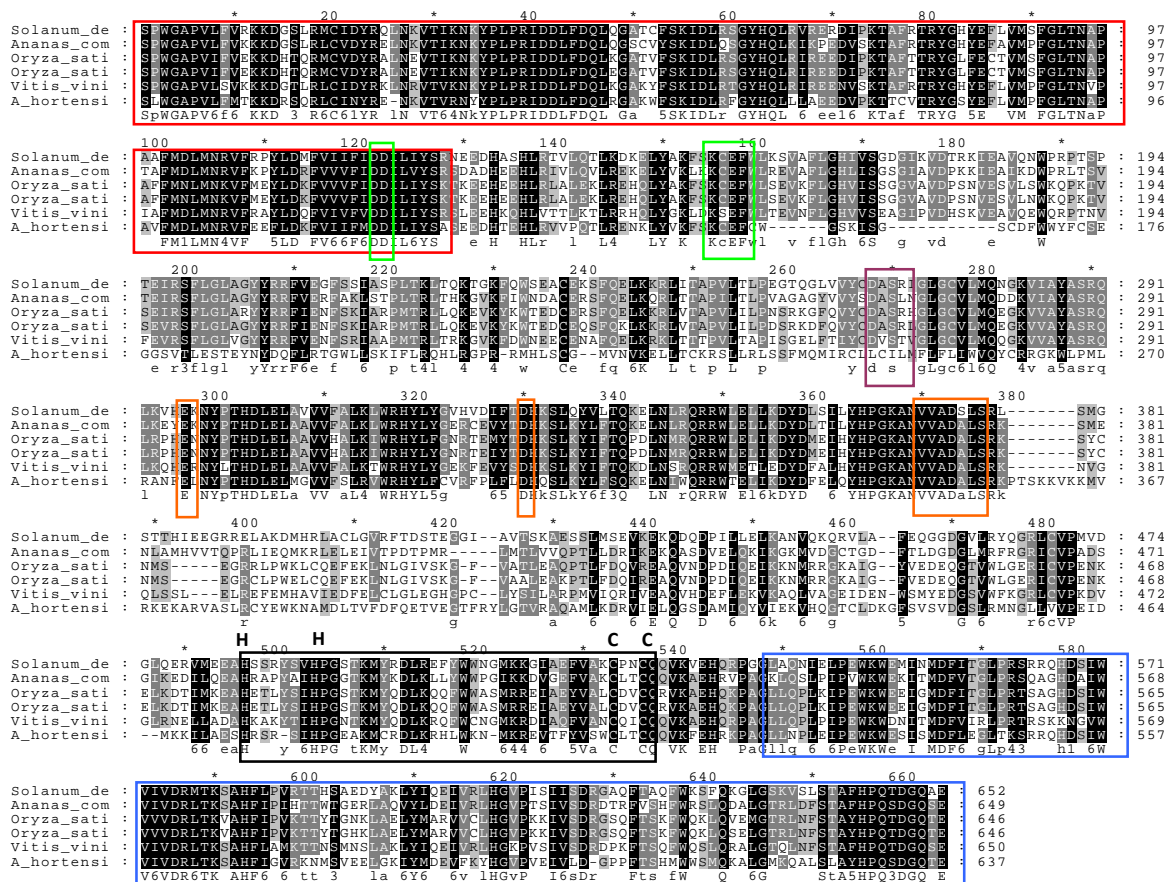


**Slika 10.** Svravnjeni aminokiselinski slijed porodice AhDR i klona AhRT\_INT dobivenog umnažanjem degeneriranim početnicama.

BLAST pretragom također je ustanovljena najveća sličnost retrotranspozonskog slijeda AhRT\_INT s retrotranspozonskim sljedovima u vrstama *Solanum demissum*, *Oryza sativa*, *Vitis vinifera*, te *Ananas comosus* koje su preuzete iz genske baze podataka (GeneBank). Najveća

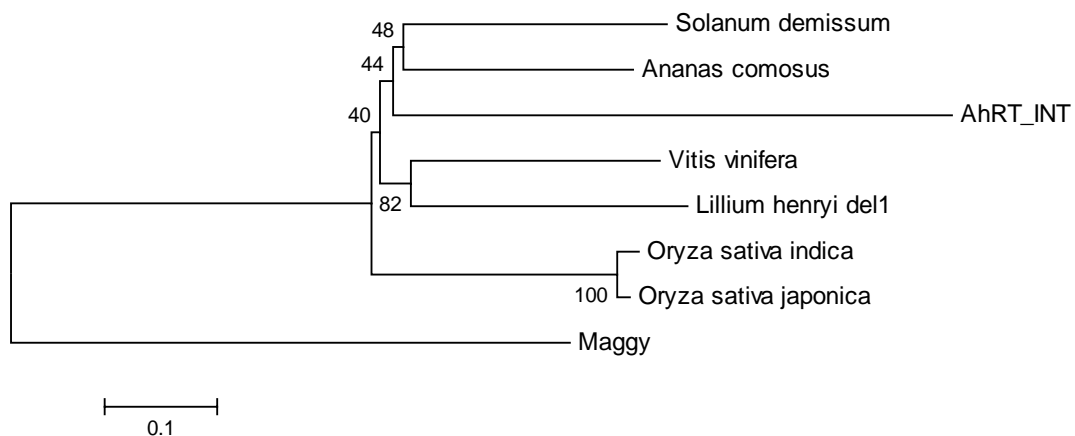
podudarnost između aminokiselinskih sljedova nalazi se u području slijeda za reverznu transkriptazu (sl. 11; uokvireno crveno) dok je nešto manja podudarnost između sljedova za integrazu (sl. 11; uokvireno plavo). U oba područja dobro su očuvana aktivna mjesta unutar gena RT i INT (sl. 11; uokvireno zeleno). Na slici 11 uokvireno crno označen je H-6-H-29-C-2-C motiv koji se nalazi na N-terminalnom kraju gena za integrazu i predstavlja mjesto vezanja za DNA. Treće područje u kojem je uočena velika homologija između aminokiselinskih sljedova predstavlja područje za ribonukleazu H (RnaseH) koje se nalazi između gena RT i INT (slika 11). Aktivna mjesta unutar gena RnaseH nisu tako dobro očuvana kao u slučaju gena RT i INT. To se odnosi na TDAS aminokiselinski motiv koji je ključan za aktivnost ribonukleaze H. Taj motiv nije očuvan u AhRT\_INT klonu (slika 11; uokvireno ljubičasto). Ostala tri elementa (sl. 11; uokvireno narančasto) koja su odgovorna za katalitičku aktivnost enzima u potpunosti su očuvana.

Usporedna analiza aminokiselinskih sljedova AhRT\_INT i elementa *dorf-1* iz vrste *A. blanda* pokazala je izuzetno malu međusobnu sličnost (nije prikazano) što bi moglo ukazivati na njihovo različito porijeklo.



**Slika 11.** Svravnjeni aminokiselinski sljedovi s područjima koja kodiraju za enzime reverznu transkriptazu (uokvirano crveno) i integrazu (uokvirano plavo). Identični aminokiselinski sljedovi osjenčani su crno a slični sivo. Zeleno su uokvirani očuvani sljedovi važni za aktivnost enzima reverzne transkriptaze i integraze, narančasto su uokvirana očuvana mjesta ključna za kaktalitičku aktivnost RnaseH, a ljubičasto je označeno aktivno mjesto RnaseH koje nije očuvano u klonu AhRT\_INT.

Sljedeći korak u istraživanju bio je utvrditi srodnost retroelementa AhRT\_INT s retroelementima iz drugih vrsta. U to istraživanje uključen je *dell* retroelement iz vrste *Lillium henryi* i Maggy iz gljive *Magnaporthe grisea*. Ukorišteno filogenetsko stablo dobiveno metodom NJ s Maggy aminokiselinskim slijedom kao „outgroup“ pokazalo je grupiranje AhRT\_INT elementa s onima iz vrsta *A. comosus* i *S. demissum* (sl. 12).



**Slika 12.** Ukorijenjeno filogenetsko stablo dobiveno metodom „Neighbor Joining“ u kojem je Maggy korišten kao „outgroup“. Vidljivo je grupiranje elementa AhRT\_INT s onima iz vrsta *A. comosus* i *S. demissum*. Brojevi označavaju „bootstrap“ vrijednosti.

## 5. Rasprava

U ovom radu pokušalo se detaljnije istražiti značajke ponavljajuće porodice AhDR iz *Anemone hortensis* za koju je ranije utvrđeno da ima raspršenu organizaciju u genomu. Osim toga, prethodna istraživanja pokazala su da ona zauzima čak oko 8% genoma vrste *A. hortensis* (Mlinarec i sur., 2009). Ta istraživanja također su pokazala da porodica AhDR u nekim svojim aspektima ima sličnosti s LTR retrotranspozonomima iz skupine *Ty3/gypsy* (Mlinarec i sur., 2009). Kako bi se porodica AhDR što točnije okarakterizirala u ovom radu korišteni su aminokiselinski slijedovi što nije bilo učinjeno u prethodnim istraživanjima. Taj pristup pokazao se opravdanim obzirom da je utvrđeno da slijed od 92 aminokiseline na C-terminalnom kraju aminokiselinskog slijeda porodice AhDR pokazuje sličnost s dijelom gena za integrazu tzv. superporodicu rve. Usporedna analiza aminokiselinskog slijeda superporodice rve s istom iz drugih vrsta pokazala je dobru očuvanost mjesta unutar gena za integrazu koja su važna za katalitičku aktivnost enzima. Naravno, svi ti rezultati nisu mogli potvrditi da je porodica AhDR dio većeg retrotranspozonskog elementa. Tek pristup koji su u svojim istraživanjima romani skupine *Ty3/gypsy* retrotranspozona koristili Souniemi i sur. (1998) pokazao je da porodica AhDR pripada većem retroelementu iz skupine *Ty3/gypsy*. Usporedna analiza AhDR slijeda i klon AhRT\_INT sa nukleotidnim slijedom duljine od 2020 pb, odnosno 637 ak, koji je dobiven umnažanjem pomoću degeneriranih početnica dizajniranih na temelju slijeda unutar gena za reverznu transkriptazu i integrazu, pokazao je da je porodica AhDR sastavni dio većeg retroelementa. Naime, PCR-om umnoženi klon AhRT\_INT sadrži dobro očuvane aminokiselinske slijedove karakteristične za reverznu transkriptazu uključivo s RnazomH i integrazu sa slijedom RT-RnazeH-INT koji je karakterističan za skupinu *Ty3/gypsy* retrotranspozona. Posebno su dobro očuvana aktivna mjesta u aminokiselinskom slijedu za reverznu transkriptazu kao i katalitičko mjesto i N-terminalno mjesto vezanja DNA u slijedu za integrazu. Sve to ukazuje na činjenicu da bi u genomu vrste *A. hortensis* mogla postojati očuvana kopija cijelog retrotranspozona. Tome u prilog ide i podatak da se nukleotidni slijed porodice AhDR prepisuje u RNA (neobjavljeni podaci) što bi moglo značiti da su sačuvane promotor i terminator regije unutar LTR-ova koje su ključne za proces transkripcije retrotranspozona. To naravno još uvijek ne znači da u genomu vrste *A. hortensis* postoji kopija retrotranspozona koja se može ugraditi u genom, odnosno, aktivna kopija retrotranspozona. Iako se danas o biljnim LTR retrotranspozonomima iz skupine *Ty3/gypsy* sve više

zna obzirom na dostupnost informacija putem različitih baza podataka, još uvijek je broj istraženih cjelovitih kopija vrlo mali. Dobro su opisani *Ty3/gypsy* retrotranspozonske porodice iz vrste *A. thaliana* (Athila) i *O. sativa* (RIRE) (Marco i Marin, 2005). Međutim, do danas pronađen je samo jedan aktivni *Ty3/gypsy* retrotranspozon LORE1 iz vrste *Lotus japonicus* (Madsen i sur., 2005).

Filogenetska analiza provedena u ovom radu pokazala je da klon AhRT\_INT pokazuje najviše sličnosti s *Ty3/gypsy* elementima iz vrsta roda *Solanum* i vrste *Ananas comosus*, dakle predstavnicima dikotiledonarnih i monokotiledonarnih biljaka. Iako je vjerodostojnost grupiranja elemenata spomenutih vrsta niska („bootstrap“ vrijednosti 44 i 48) kao i njihovog grupiranja s retroelementima iz vrste *Vitis vinifera* i *del1* elementom iz vrste *Lillium henryi* („bootstrap“ vrijednosti 40) može se reći da one pripadaju istoj skupini. Ovako niska vjerodostojnost dobivenog filogenetskog stabla vjerojatna je posljedica nedostatka jasno diferenciranih razlika između analiziranih elemenata. Dobiveno filogenetsko stablo također ukazuje da je zajednički predak analiziranih elemenata postojao prije rezdvajanja mono- i dikotiledonarnih biljaka i podupire pretpostavku o vertikalnom širenju retroelemenata. Obično su u dosadašnjim filogenetskim istraživanjima retrotranspozona korišteni kratki sljedovi unutar gena za reverznu transkriptazu dobiveni umnažanjem pomoću PCR-a (Novikova i sur. 2008). Da bi se dobila cjelovitija slika porijekla i filogenetskog položaja retroelementa iz vrste *A. hortensis*, filogenetska analiza trebala bi uključiti slijed unutar gena za reverznu transkriptazu koji je korišten u dosadašnjim istraživanjima i usporediti ga s elementima iz puno većeg broj vrsta. Interesantno, klon AhRT\_INT nije pokazao sličnost s elementom *dorf-1* koji je opisan u srodnoj vrsti *Anemone blanda* (Hageman i sur. 1993). Taj rezultat mogao bi se objasniti različitim porijeklom retroelemenata iz *A. hortensis* i *A. blanda* ili su kod ovih vrsta okarakterizirani različiti dijelovi retroelementa istog porijekla. Drugo objašnjenje čini se opravdanim obzirom da element *dorf-1* nema prepoznatljiva područja za reverznu transkriptazu i integrazu. Osim toga oba elementa pokazuju sličnost s elementom *del1*. S druge strane ne može se isključiti niti pretpostavka o njihovom različitom porijeklu ili je element *dorf-1* nakupio brojne mutacije tijekom evolucije obzirom na prisutnost velikog broja stop kodona.

Obzirom na rezultate dobivene u ovom radu te one iz prethodnih istraživanja koja su pokazala da retroelement iz vrste *A. hortensis* ima raspršenu organizaciju može se pretpostaviti

da on ne pripada skupini Chromovirusa koji imaju kromodomeni odgovornu za ciljanu ugradnju u heterokromatinska područja. Kako bi se ova tvrdnja dokazala potrebno je okarakterizirati cijeli retrotranspozon što će biti cilj daljnjih istraživanja. Velika količina porodice AhDR u genomu vrste *A. hortensis* (oko 8%) ukazuje da je retroelement u kojem se nalazi porodica AhDR, u možda ne tako davnoj evolucijskoj prošlosti, bio aktivan. To se može povezati s klimatološkim promjenama i time uzrokovanim stresom koji je doveo do aktivacije retrotranspozona. Naime, opće je poznato da stres uzrokuje aktivaciju retrotranspozona i da danas poznate aktivne kopije retrotranspozona, kao što je *Tto1* iz duhana, mogu biti aktivirane samo u kulturi biljnog tkiva i/ili nakon ozljeđivanja (Hirochika i sur. 1996). Obzirom da su vrste iz kompleksa *Anemone* kozmopolitske vrste koje žive na različitim staništima i klimatskim uvjetima, bilo bi dobro istražiti da li je i u kolikoj mjeri retroelement opisan u ovom radu uključen u adaptivnu specijaciju, posebice stoga jer su istraživanja pokazala da se porodica AhDR nalazi i u drugim vrstama ovog kompleksa ali je njena zastupljenost u genomima različita (Mlinarec i sur. 2009).



## 6. Zaključak

Na temelju postavljenih ciljeva i dobivenih rezultata u ovom radu može se zaključiti: (i) da porodica AhDR iz vrste *Anemone hortensis* ima dijelove koji su slični dijelovima LTR retrotranspozona iz skupine Ty3/gypsy, (ii) da je porodica AhDR dio Ty3/gypsy retrotranspozona i (iii) da pripada skupini retrotranspozona koji su široko rasprostranjeni kod mono- i dikotiledonarnih biljnih vrsta.

## 7. Popis literature

- Besendorfer V, Krajacic-Sokol I, Jelenic S, Puizina J, Mlinarec J, Sviben T, Papes D. 2005. Two classes of 5S rDNA unit arrays of the silver fir, *Abies alba* Mill.: structure, localization and evolution. *Theor Appl Genet.* 110(4): 730-741.
- Britten RJ & Kohne DE. 1968. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science.* 161(841): 529-540.
- Bureau TE, Ronald PC, Wessler SR. 1996. A computer-based systematic survey reveals the predominance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(16): 8524-8529.
- Bureau TE, Wessler SR. 1992. Tourist: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *Plant Cell.* (10): 1283-1294.
- Bureau TE, Wessler SR. 1994. Stowaway: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell.* (6): 907-916.
- Butler M, Goodwin T, Simpson M, Singh M, Poulter R. 2001. Vertebrate LTR retrotransposons of the Tf1/sushi group. *J Mol Evol.* (3): 260-274.
- Cavalier-Smith T, Beaton MJ. 1999. The skeletal function of non-genic nuclear DNA: new evidence from ancient cell chimaeras. *Genetica.* 106(1-2): 3-13.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature.* 371(6494): 215-220.
- Consortium, T.C.e.S. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. The *C. elegans* Sequencing Consortium. *Science.* 282: 2012-2018.
- Cui L, Wall PK, Leebens-Mack JH, Lindsay BG, Soltis DE, Doyle JJ, Soltis PS, Carlson JE, Arumuganathan K, Barakat A, Albert VA, Ma H, dePamphilis CW. 2006. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res.* (6): 738-749.

- Cullis CA, Schweizer D. 1974. Repetitious DNA in some *Anemone* species. *Chromosoma*. 44: 417-421.
- Feschotte C, Jiang N, Wessler SR. 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet*. (5): 329-341.
- Frediani M, Gelati MT, Maggini F, Galasso I, Minelli S, Ceccarelli M, Cionini PG. 1999. A family of dispersed repeats in the genome of *Vicia faba*: structure, chromosomal organization, redundancy modulation, and evolution. *Chromosoma*. 108(5): 317-324.
- Hagemann S, Scheer B, Schweizer D. 1993. Repetitive sequences in the genome of *Anemone blanda*: identification of tandem arrays and of dispersed repeats. *Chromosoma*. 102(5): 312-324.
- Hirochika H., Otsuki H., Yoshikawa M., Otsuki Y., Sugimoto K i Takeda S. 1996. Autonomous transposition of the tobacco retrotransposon *Tto1* in rice. *Plant Cell*. 8: 725-734.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96(1): 23-28.
- Ito H, Nasuda S, Endo TR. 2004. A direct repeat sequence associated with the centromeric retrotransposons in wheat. *Genome*. 47(4): 747-756.
- Kumar A, Bennetzen JL. 1999. Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet*. 33: 479-532.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409: 860-921.
- Leeton PR, Smyth DR. 1993. An abundant LINE-like element amplified in the genome of *Lilium speciosum*. *Mol Gen Genet*. 237(1-2): 97-104.
- Leitch AR, Leitch IJ. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*. 320(5875): 481-483.
- Lewin, Benjamin. *Genes IX*. Jones and Bartlett Publishers, 2008. ISBN-13: 978-0-7637-4063-4; ISBN-10: 0-7637-4063-2

- Madsen LH, Fukai E, Radutoiu S, Yost CK, Sandal N, Schauser L, Stougaard J. 2005. LORE1, an active low-copy-number TY3-gypsy retrotransposon family in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant J.* 44(3): 372-381.
- Malik HS, Eickbush TH. 1999. Modular evolution of the integrase domain in the Ty3/Gypsy class of LTR retrotransposons. *J Virol.* 73(6): 5186-5190.
- Malik HS, Eickbush TH. 2001. Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses. *Genome Res.* 11(7): 1187-1197.
- Marco A, Marín I. 2005. Retrovirus-like elements in plants. *Recent Res. Devel. Plant Sci.* ISBN: 81-7736-245-3.
- Marín I, Lloréns C. 2000. Ty3/Gypsy retrotransposons: description of new *Arabidopsis thaliana* elements and evolutionary perspectives derived from comparative genomic data. *Mol Biol Evol.* 17(7): 1040-1049.
- Marracci S, Batistoni R, Pesole G, Citti L, Nardi I. 1996. Gypsy/Ty3-like elements in the genome of the terrestrial *Salamander hydromantes* (Amphibia, Urodela). *J Mol Evol.* 43(6): 584-593.
- Miller K, Lynch C, Martin J, Herniou E, Tristem M. 1999. Identification of multiple Gypsy LTR-retrotransposon lineages in vertebrate genomes. *J Mol Evol.* 49(3): 358-366.
- Miller WJ, McDonald JF, Pinsker W. 1997. Molecular domestication of mobile elements. *Genetica.* 100(1-3):261-270.
- Mlinarec J, Chester M, Siljak-Yakovlev S, Papeš D, Leitch AR, Besendorfer V. 2009. Molecular structure and chromosome distribution of three repetitive DNA families in *Anemone hortensis* L. (Ranunculaceae). *Chromosome Res.* DOI 10.1007/s10577-009-9025-2.
- Mlinarec J, Papeš D, Besendorfer V. 2006. Ribosomal, telomeric and heterochromatin sequences localisation in the karyotype of *Anemone hortensis*. *Bot J Linn Soc.* 150: 177-186.

- Nekrutenko A, Li WH. 2001. Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends Genet.* 17(11): 619-621.
- Neumann P, Nouzová M, Macas J. 2001. Molecular and cytogenetic analysis of repetitive DNA in pea (*Pisum sativum* L.). *Genome.* 44(4): 716-728.
- Novikova O, Mayorov V, Smyshlyaev G, Fursov M, Adkison L, Pisarenko O, Blinov A. 2008. Novel clades of chromodomain-containing Gypsy LTR retrotransposons from mosses (Bryophyta). *Plant J.* 56(4):562-574.
- Poulter R, Butler M. 1998. A retrotransposon family from the pufferfish (fugu) *Fugu rubripes*. *Gene.* 215(2): 241-249.
- Rothfels K, Sexsmith E, Heimburger M, Krause MO. 1966. Chromosome size and DNA content of species of *Anemone* and related genera (Ranunculaceae). *Chromosoma.* 20: 54-74.
- Saghai-Marroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA.* (24): 8014-8018.
- Schuettpeitz E, Hoot SB, Samuel R, Ehrendorfer F (2002) Multiple origins of Southern hemisphere *Anemone* (Ranunculaceae) based on plastid and nuclear sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 231: 143-151
- Staginnus C, Winter P, Desel C, Schmidt T, Kahl G. 1999. Molecular structure and chromosomal localization of major repetitive DNA families in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Plant Mol Biol.* 39(5): 1037-1050.
- Suoniemi A, Tanskanen J, Schulman AH. 1998. Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom. *Plant J.* 13(5): 699-705.
- Ulbrich E. 1905-1906. Über die systematische Gliederung and geographische Verbreitung der Gattung *Anemone* L. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 37: 172:334
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science.* 291:1304-1351.

Vitte C, Panaud O. 2003. Formation of solo-LTRs through unequal homologous recombination counterbalances amplifications of LTR retrotransposons in rice *Oryza sativa* L. *Mol Biol Evol.* (4): 528-540.

Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss GM, Stuessy TF, Mabuchi T, Park JM, Jang CG, Sun BY. 2007. Chromosomal stasis in diploids contrasts with genome restructuring in auto- and allopolyploid taxa of *Hepatica* (Ranunculaceae). *New Phytol.* 174(3): 669-682.

Wright DA, Voytas DF. 1998. Potential retroviruses in plants: Tat1 is related to a group of *Arabidopsis thaliana* Ty3/gypsy retrotransposons that encode envelope-like proteins. *Genetics.* 149(2): 703-715.

Jan Harapin

Karakterizacija *Ty3/gypsy* retrotranspozona iz vrste *Anemone hortensis* L.

U ovom radu istražene su značajke porodice AhDR izolirane iz vrste *Anemone hortensis* L. za koju je u prethodnim istraživanjima utvrđeno da pokazuje sličnosti s retroelementima iz skupine *Ty3/gypsy* i raspršenu organizaciju u genomu. Nadalje željelo se utvrditi da li je porodica AhDR dio većeg retroelementa te utvrditi njegovu srodnost s već poznatim LTR retrotranspozonima. Na temelju usporedbe aminokiselinskog slijeda AhDR s retroelementima iz drugih vrsta utvrđeno je da se na C-terminalnom kraju nalazi dio gena za integrazu sličan onima iz retrotranspozona skupine *Ty3/gypsy*. Upotrebom degeneriranih početnica, dizajniranih na temelju gena za reverznu transkriptazu i integrazu karakterističnih za *Ty3/gypsy* retroelemente, u lančanoj reakciji polimerazom (PCR) umnožen je i sekvenciran klon AhRT\_INT duljine 2020 pb (637 ak). Usporedna analiza porodice AhDR i klona AhRT\_INT pokazala je da je porodica AhDR dio klona AhRT\_INT a time i većeg retroelementa. Klon AhRT\_INT pokazao je visok stupanj očuvanosti mjesta koja su ključna za katalitičku aktivnost enzima reverzne transkriptaze i integreze i mjesta vezanja za DNA što upućuje na vjerojatno postojanje cjelovite kopije *Ty3/gypsy* retroelementa u genomu vrste *A. hortensis*. Filogenetska analiza pokazala je da je analizirani klon AhRT\_INT najbliži *Ty3/gypsy* retroelementima iz vrsta roda *Solanum* i vrste *Ananas comosus*. Osim toga utvrđena je i srodnost s *dell1* retroelementom iz vrste *Lilium henryi*. Nasuprot tome vrlo mala sličnost utvrđena je između *dorf-1* elementa iz srodne vrste *Anemone blanda* i klona AhRT\_INT. Na temelju provedenih istraživanja nemoguće je utvrditi da li je razlog tome njihovo različito porijeklo, razlike nastale uslijed nagomilavanja mutacija u elementu *dorf-1* ili su uspoređivani različiti dijelovi retroelementa istog porijekla.

Ključne riječi: *Anemone hortensis* L., LTR retrotranspozon, *Ty3/gypsy*

## 7. Summary

Jan Harapin

Characterisation of *Ty3/gypsy* retrotransposon from *Anemone hortensis* L.

The characteristics of the AhDR family isolated from *Anemone hortensis* L. were examined. Previous research has found the AhDR sequence to show similarity to the *Ty3/gypsy* class of retroelements as well as having a dispersed pattern throughout the entire genome. Furthermore, the intention was to establish whether or not the AhDR family is part of a larger retroelement and to determine its relationship to already known LTR retrotransposons. Based on the comparison of the amino acid sequence of the AhDR family with the sequences of retroelements from diverse species, the presence of a part of the integrase gene was found on the C-terminus which showed similarity to the integrase genes of the *Ty3/gypsy* class of retrotransposons. Degenerate primers, designed according to the reverse transcriptase and integrase gene sequences of typical *Ty3/gypsy* retroelements were used for PCR amplification and subsequent sequencing of the 2020 bp (637 aa) AhRT\_INT clone. Comparative analysis of the AhDR family and the AhRT\_INT clone showed that the AhDR family is part of the AhRT\_INT clone and therefore part of a larger retroelement. The AhRT\_INT clone was highly conserved with regard to key amino-acid sequences that form the catalytic core and active sites, as well as DNA-binding sites, of the enzymes reverse transcriptase and integrase, which clearly shows that a complete copy of the *Ty3/gypsy* retroelement is probably present in the genome of *A. hortensis*. Phylogenetic analysis has shown that the analyzed AhRT\_INT clone exhibits highest similarity to the *Ty3/gypsy* retroelements from the *Solanum* and *Ananas comosus*. Sequence similarity with the *dell* element from the species *Lilium henryi* has also been established. A significantly lower degree of sequence similarity was, however, established between the *dorf-1* element of the closely related *Anemone blanda* species and the AhRT\_INT clone. Based on this research alone it is impossible to establish whether or not the reason for this sequence dissimilarity lies in their divergent origin, the differences that resulted from the accumulation of mutations



in the *dorf-1* element or in the fact that different parts of the retroelement of the same origin were compared.

Key words: *Anemone hortensis* L., LTR retrotransposon, *Ty3/gypsy*