

**Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek**

Lea Ester

**AKTIVNOST RETROTRANSPOZONA Tpv2 U
STANICAMA UROČNJAKA *Arabidopsis thaliana* L.**

Diplomski rad

Zagreb, 2002.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

AKTIVNOST RETROTRANSPOZONA Tpv2 U STANICAMA UROČNJAKA *Arabidopsis thaliana* L.

Lea Ester
Zavod za molekularnu biologiju
Prirodoslovno-matematički fakultet, Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

U ovom radu istraživana je aktivnost hibridnog retrotranspozona graha Tpv2 u heterolognom domaćinu, biljci *Arabidopsis thaliana*. Hibridni retroelement Tpv2 sastavljen je iz dijelova dviju nefunkcionalnih kopija izoliranih iz genoma graha *Phaseolus vulgaris*. U svrhu olakšanog praćenja aktivnosti u retrotranspozon je ugrađen intron iz gena za glutamin sintetazu biljke *Lotus japonicus*. Oblici retrotranspozona sa i bez introna, Tpv2i i Tpv2, ugrađeni su u genom uročnjaka posredstvom bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Za transformaciju stanica uročnjaka korišteni su korjenčići ekotopiva Wassilevskia i Columbia. Time su dobivena četiri tipa transgenih linija uročnjaka, iz kojih je nakon regeneracije izdanaka i mikrorazmnožavanja izolirana genomska DNA. Rezultati dobiveni lančanom reakcijom polimerazom, pri čemu su korištene početnice koje omeđuju intron, i hibridizacijom po Southernu, gdje je kao proba korišten plazmid pSKTpv2, pokazali su da niti Tpv2 niti Tpv2i oblik retrotranspozona nisu aktivni u biljci *A. thaliana*. Također je utvrđeno da nema homologne rekombinacije između LTR-ova ovog retrotranspozona.

Rad je pohranjen u Centralnoj biblioteci Biološkog odsjeka, Rooseveltov trg 6.

Ključne riječi: retrotranspozon / Tpv2 / transpozicija / *Arabidopsis thaliana*

Voditelji: Dr. sc. Dražena Papeš, prof.
Dr. sc. Srećko Jelenić

Ocjenjivači: Dr. sc. Dražena Papeš, prof.
Dr. sc. Ivan Regula, prof.
Dr. sc. Mirjana Kalafatić, prof.

Rad prihvaćen: 25. rujna 2002.

(52 stranice, 9 slika, 1 tablica, 53 literaturna navoda, hrvatski jezik)

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

ACTIVITY OF Tpv2 RETROTRANSPOSON IN *Arabidopsis thaliana* CELLS

Lea Ester
Department of Molecular Biology
Faculty of Science, Rooseveltov trg 6, Zagreb

ABSTRACT

In this work research was performed on the activity of hybrid common bean Tpv2 retrotransposon in heterologous host, *Arabidopsis thaliana*. The hybrid Tpv2 retroelement was made out of the fragments of two non-functional copies isolated from the genome of *Phaseolus vulgaris*. For the purpose of easier detection of retrotransposon activity the intron from the glutamin synthetase gene of *Lotus japonicus* has been inserted into it. The form of retrotransposon containing intron, Tpv2i, as well as the one without it, Tpv2, was inserted into *A. thaliana* genome by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Roots of Wassilevskia and Columbia ecotypes were used for the transformation of *A.thaliana* cells. Four types of *Arabidopsis* transgenic lines were gained this way, and following shoot regeneration and micropropagation genomic DNA was isolated. Results obtained by polymerase chain reaction, using primers flanking intron, as well as by Southern blotting, using plasmid pSKTpv2 as the probe, indicate that neither Tpv2 nor Tpv2i retrotransposon form were transpositionally active in *A. thaliana* cells. It was also shown that homologous recombination between LTRs of Tpv2 retrotransposon did not happen.

Thesis deposited at: Department of Biology, Central library, Rooseveltov trg 6.

Key words: retrotransposon / Tpv2 / transposition / *Arabidopsis thaliana*

Supervisors: Dr. Dražena Papeš, Prof.
Dr. Srećko Jelenić

Reviewers: Dr. Dražena Papeš, Prof.
Dr. Ivan Regula, Prof.
Dr. Mirjana Kalafatić, Prof.

Thesis accepted: September 25th 2002

(52 pages, 9 figures, 1 table, 53 references, original in Croatian)

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Dražene Papeš i pomoćnim voditeljstvom dr. sc. Srećka Jelenića.

Tijekom dugotrajne izrade ovog rada bila mi je nezamjenjiva pomoć mog pomoćnog voditelja dr. sc. Srećka Jelenića, kojem zahvaljujem na strpljenju, brojnim korisnim savjetima, svemu što me naučio i vremenu koje mi je posvetio.

Prof. dr. sc. Draženi Papeš zahvaljujem na susretljivosti i pristupačnosti.

Veliko hvala i mr. sc. Petru Mitrikeskom i mr. sc. Ivanu Krešimiru Svetecu s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta na pomoći pri završnim analizama.

Zahvaljujem i svima na trećem katu Biološkog odsjeka na podršci pri izradi ovog rada.

Lea Ester, rujan 2002.

SADRŽAJ

1.UVOD.....	1
1.1. LTR-RETROTRANSPOZONI.....	1
1.1.1. Životni ciklus LTR-retrotranspozona.....	3
1.1.1.1. Transkripcija.....	4
1.1.1.2. Translacija i oblikovanje čestica sličnih virusnima.....	4
1.1.1.3. Reverzna transkripcija.....	5
1.1.1.4. Integracija.....	7
1.2. LTR-RETROTRANSPOZONI BILJAKA.....	8
1.2.1. Regulacija aktivnosti LTR-retrotranspozona u biljaka.....	10
1.2.2. Retrotranspozoni u genomu uročnjaka <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
1.2.3. Porijeklo i evolucija biljnih retrotranspozona.....	14
1.2.3.1. Učinak retrotranspozona na evoluciju biljnih gena i genoma.....	15
1.2.4. Retrotranspozoni kao genetički biljezi.....	16
1.3. RETROTRANSPOZON Tpv2.....	17
1.4. OBRAZLOŽENJE TEME I CILJ RADA.....	19
2. MATERIJALI I METODE.....	21
2.1. MATERIJALI.....	21
2.1.1. Organizmi.....	21
2.1.1.1. Biljka uročnjak <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2.1.1.2. Bakterija <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.1.1.3. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	21
2.1.2. Plazmidi.....	21
2.1.2.1. Plazmidi pSKTpv2 i pSKTpv2i.....	21
2.1.2.2. Binarni vektor pBIB-HYG.....	22
2.1.2.3. Plazmidi pTpv2 i pTpv2i.....	23
2.1.3. Kemikalije, enzimi i komercijalna DNA.....	24
2.1.4. Otopine.....	25
2.1.4.1. Izolacija plazmidne DNA.....	25
2.1.4.2. Izolacija biljne genomske DNA.....	25
2.1.4.3. DNA digestija i izolacija s gela.....	26
2.1.4.4. Isključavanje sjemenki uročnjaka.....	26
2.1.4.5. Hibridizacija po Southernu.....	26
2.1.5. Hranjive podloge.....	28
2.2. METODE.....	29
2.2.1. Sterilizacija i isključavanje sjemenki uročnjaka <i>A. thaliana</i> , te priprema korjenčića za transformaciju.....	29
2.2.2. Transformacija korjenčića uročnjaka <i>A. thaliana</i> bakterijom <i>Agrobacterium tumefaciens</i> i kultivacija transformiranog tkiva.....	30
2.2.3. Regeneracija, mikrorazmnožavanje i zakorjenjivanje transgenih izdanaka.....	30
2.2.4. Izolacija genomske DNA iz transgenih linija uročnjaka.....	31
2.2.5. Izolacija plazmidne DNA.....	32
2.2.6. Restriksijska digestija DNA.....	33
2.2.7. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu.....	33

2.2.8. Izolacija DNA iz agaroznog gela.....	34
2.2.9. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	35
2.2.10. Neradioaktivna hibridizacija po Southernu.....	35
3. REZULTATI.....	38
3.1. TRANSFORMACIJA UROČNJAKA I REGENERACIJA TRANSGENIH BILJAKA.....	38
3.2. ANALIZA AKTIVNOSTI RETROTRANSPOZONA Tpv2i LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM.....	41
3.3. ANALIZA AKTIVNOSTI RETROTRANSPOZONA Tpv2 I Tpv2i HIBRIDIZACIJOM PO SOUTHERNU.....	43
4. RASPRAVA.....	45
5. ZAKLJUČCI.....	48
6. LITERATURA.....	49

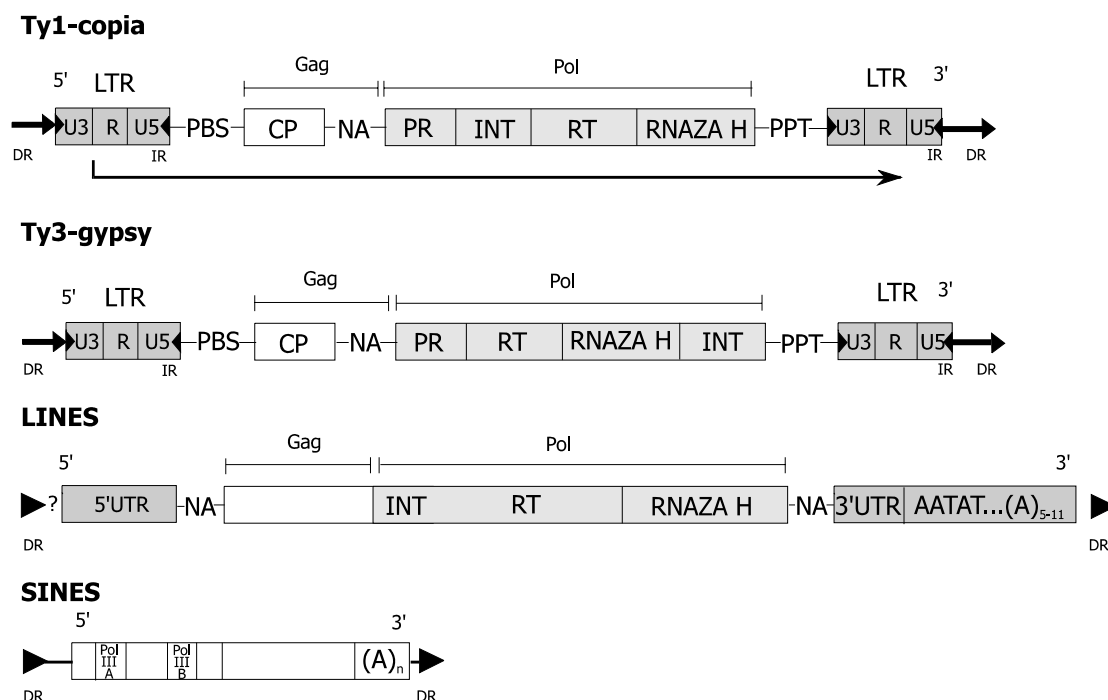
1. UVOD

1.1. LTR-RETROTRANSPOZONI

Retrotranspozoni su najzastupljenija grupa eukariotskih pokretnih genetičkih elemenata, čija je osnovna značajka umnažanje putem reverzne transkripcije. Prema strukturi dijele se u dvije osnovne skupine: LTR-retrotranspozone, koji sadrže duge rubne ponavljajuće sljedove (LTR, "long terminal repeat") i ne-LTR retrotranspozone ili retropozone, koji ne sadrže LTR-ove (Slika 1) (Kumar i Bennetzen, 1999.). LTR-retrotranspozoni sadrže između LTR-ova jedan ili nekoliko otvorenih okvira čitanja (ORF, "open reading frame"), u kojima se nalaze kodirajuće regije za proteine uključene u životni ciklus elementa. Prema redosljedju kodirajućih regija unutar ORF-a LTR-retrotranspozoni su podijeljeni u dvije podskupine: Ty1-*copia* i Ty3-*gypsy* (Slika 1). Dužina LTR-retrotranspozona kreće se u rasponu od nekoliko kb do oko 12 kb, od čega najčešće 300-500 pb otpada na LTR-sljedove, a 3-5 kb na unutarnju domenu (Koniczny i sur., 1991.). Najkraći poznati retroelement Ty5 iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dugačak je 3,2 kb, a najdulji element je 12,1 kb velik BARE-1 u vrste *Hordeum vulgare* (Feschotte i sur., 2002., Kumar i Bennetzen, 1999.). Broj kopija određenog elementa u genomu varira ovisno o vrsti domaćinu. Tako u genomu vrste *Arabidopsis thaliana* postoji jedna do tri kopije retrotranspozona *Ta1* (Voytas i Ausubel, 1988.), dok genom vrste *Lilium henryi* sadrži oko 13000 kopija elementa *dell*.

LTR-retrotranspozoni imaju izravne duge ponavljajuće sekvence (LTR-ove) velike nekoliko stotina do preko 5000 baznih parova. LTR-sekvence ne kodiraju proteine, već sadrže promotore i terminatore transkripcije LTR-retrotranspozona. Transkripcija započinje na 5'-kraju slijeda R u 5'-LTR-u i završava na 3'-kraju slijeda R u 3'-LTR-u. Prilikom transkripcije nastaje jedinstvena molekula mRNA strukture 5'-R-U5-PBS-kodirajuća regija-PPT-U3-R-3', gdje je R ponavljajući RNA slijed, U5 jedinstvena 5'RNA, PBS vezujuće mjesto za početnicu, PPT polipurinski niz, a U3 jedinstveni 3'-slijed (Slika 1). Proteini kodirani regijama *gag* i *pol* sintetizirani su kao poliprotein koji se posttranslacijski cijepa na funkcionalne peptide pomoću proteaze kodirane regijom *pol*. Regija *gag* kodira proteine uključene u sastavljanje čestica

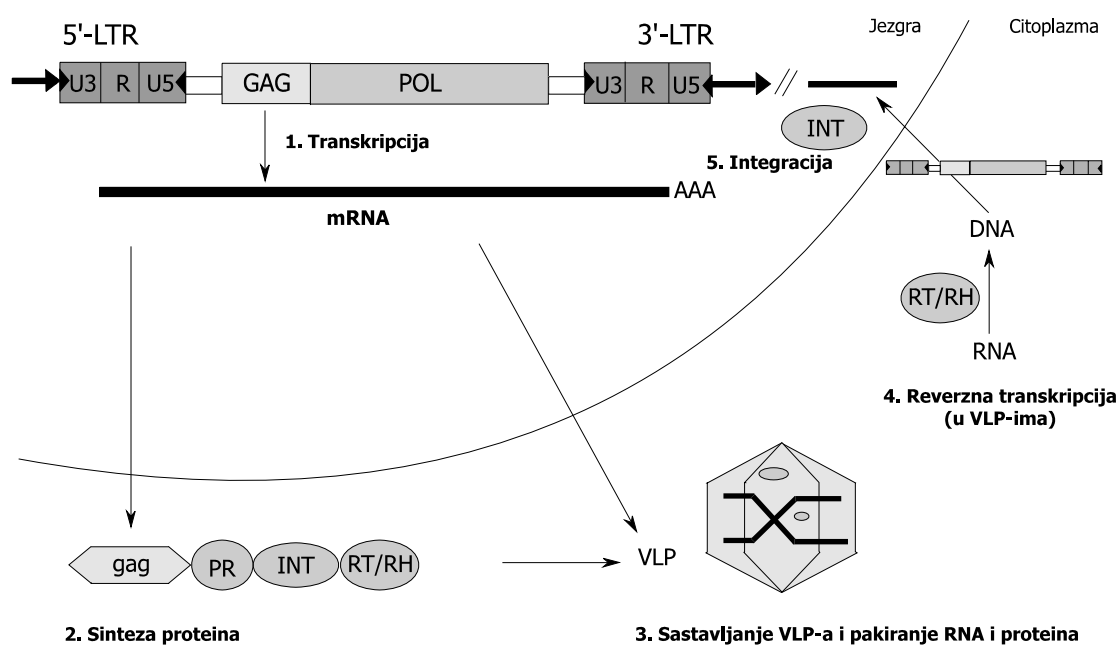
sličnih virusnima (VLP, “virus-like particles”) te pakiranje retrotranspozonske RNA i proteina (Slika 2). Regija *pol* kodira proteazu (*PR*), reverznu transkriptazu (*RT*) i RNazu H, potrebne za umnažanje retrotranspozona, te integrazu (*INT*) koja omogućuje ugradnju DNA oblika retrotranspozona u novo mjesto u genomu (Slika 1). U nekim slučajevima su proteinski produkti Gag i Pol kodirani unutar jedinstvenog translacijskog okvira čitanja, a ponekad su to dva ili čak tri okvira čitanja. To dovodi do potrebe za pomakom okvira čitanja (“frame-shift”) ili translacijske reinicijacije, što najčešće uzrokuje jaču ekspresiju uzvodnih gena (*GAG*) u usporedbi s nizvodnima (*PR*, *RT*, *RNaza H*, *INT*).



Slika 1. Shematski prikazi struktura retrotranspozona skupina Ty1-copia, Ty3-gypsy, LINE i SINE. LTR-retrotranspozoni sadrže duge ponavljajuće terminalne sljedove (LTR-ove) u izravnoj orijentaciji. LTR čine U3, R i U5 regije, koje sadrže signale za inicijaciju i terminaciju transkripcije. Tanka strelica ispod retrotranspozona grupe Ty1-copia predstavlja transkript. Transkripcija započinje na 5'-kraju R regije 5'-LTRa i završava na 3'-kraju R regije 3'-LTRa. Geni su organizirani najčešće unutar jednog ili dva otvorena okvira čitanja, čiji su produkti: protein ovojnice (CP, "capsid-like protein"), integraza (INT), proteaza (PR), reverzna transkriptaza (RT) i RNaza H. Prikazane su i sekvence: PBS ("primer binding sites"), PPT ("polypurine tracts"), NA ("nucleic acid binding moiety"), IR ("inverted terminal repeats"), DR ("flanking target direct repeat"), 5'UTR ("5'-untranslated region"), 3'UTR ("3'-untranslated region") i Pol III A i B – mjesta na promotoru koja prepoznaje RNA polimeraza III. Sheme nisu prikazane u pravim omjerima. (Kumar i Bennetzen, 1999.)

1.1.1. Životni ciklus LTR-retrotranspozona

Životni ciklus LTR-retrotranspozona istražen je najdetaljnije kod retrotranspozona kvasca Ty1 i retrotranspozona vinske mušice *copia*, te njima srodne skupine retrotranspozona Ty1-*copia*. Odvija se u nekoliko koraka: transkripcija DNA-kopije elementa, translacija, oblikovanje čestica sličnih virusnima u citoplazmi (u kojima se reverznom transkripcijom sintetizira nova DNA-kopija), prijenos nove kopije elementa u jezgri i integracija u genomsku DNA (Slika 2). Transpozicijski ciklus LTR-retrotranspozona vrlo je sličan životnom ciklusu retrovirusa, s razlikom što retrotranspozoni nemaju ORF *env*, koji kodira protein ovojnice potreban za infektivnost (Kumar, 1998., Wright i Voytas, 1998.).



Slika 2. Životni ciklus LTR-retrotranspozona. (Grandbastien, 1998.)

1.1.1.1. Transkripcija

Transkripcija započinje u 5'-LTR-u na početku regije R i završava u 3'-LTR-u na kraju regije R. Nastale molekule RNA služe kao kalupi za reverznu transkripciju i kao mRNA za sintezu proteina retrotranspozona.

Poznato je nekoliko sekvenci u 5'-LTR-u, koje su važne za transkripciju (Pouteau i sur., 1994., Takeda i sur., 1998., Takeda i sur., 1999.). Retrotranspozon Tnt1 u regiji U3 sadrži nekoliko *cis*-djelujućih sekvenci, uključujući kratki palindromski slijed BI i segment od 31pb, koji se ponavlja uzastopno u 3 ili 4 kopije, nazvan BII. Regije BI i BII su transkripcijski aktivatori uključeni u aktivaciju retrotranspozona Tnt1 biotičkim i abiotičkim čimbenicima (Grandbastien, 1998.). Kod retrotranspozona Tto1 također je u regiji U3 nađen ponavljajući niz duljine 13pb, uključen u ekspresiju u protoplastima, kalusu, te u listovima nakon ranjavanja i primjene metil-jasmonata (Takeda i sur., 1999.). Aktivacija transkripcije regulirana tim sekvencama slična je aktivaciji gena koji uvjetuju obrambeni odgovor biljke na napad patogena. Spomenute *cis*-regulirajuće sekvence pokazuju sličnost s "H-box" motivom odgovornim za aktivaciju nekih biljnih obrambenih gena (Grandbastien, 1998.). Istraživanja u kojima je LTR vezan za gen biljeg pokazala su da su LTR-promotori retrotranspozona Tnt1 i Tto1 aktivni i u heterolognim sustavima, uključujući transgeni uročnjak, rajčicu ili rižu i da su događaji vezani uz ekspresiju slični onima u prirodnom domaćinu duhanu. U heterolognom domaćinu je zadržana aktivacija u biotičkim i abiotičkim stresnim uvjetima (Hirochika i sur., 1996., Mhiri i sur., 1999.).

1.1.1.2. Translacija i oblikovanje čestica sličnih virusnima

Glasnička RNA nastala prepisivanjem nosi informaciju za strukturni protein Gag (sudjeluje u građi VLP-a) i enzime proteazu, integrazu, reverznu transkriptazu i ribonukleazu H.

Za normalni životni ciklus retroelementa potrebna je 10-100 puta veća količina proteina Gag u odnosu na enzime, jer je Gag potreban u velikim količinama za izgradnju čestica sličnih virusnima. Spomenute regije *gag* i *pol* su najčešće smještene u dva otvorena okvira čitanja koji su pomaknuti za jedan nukleotid (najčešće -1).

Tijekom translacije, u 90-99% slučajeva ribosomi završe sintezu samo proteina Gag, a u 1-10% slučajeva zbog pomaka okvira čitanja nastane poliprotein Gag-Pol. Elementi kod kojih se regije *gag* i *pol* nalaze unutar istog okvira čitanja, problem omjera njihovih produkata rješavaju cijepanjem transkripta, specifičnom razgradnjom enzimske domene *pol* (Grandbastien, 1998.) ili ribosomi “previde” stop-kodon na kraju *gag*-regije i “readthrough supresijom” nastaje Gag-Pol poliprotein (Jelenić, 1997.).

Pakiranje RNA ovisi o specifičnim interakcijama između 5'-kraja genomske RNA (do start kodona) i dijela Gag proteina koji veže amino-kiseline, a sastavljanje čestica nalik virusnima o interakcijama C-krajeva proteina Gag, ključnih za interakciju monomer-monomer (Katz i Skalka, 1994.). Pravilno oblikovanje VLP-a te pakiranje čimbenika uključenih u reverznu transkripciju osnovni su preduvjeti za nastanak novih DNA-kopija elementa i njihovu integraciju u genom domaćina. Enzimi PR, INT i RT/RH dio su poliproteina Gag-Pol, te je njihova pravilna ugradnja u VLP osigurana interakcijom Gag-dijela ovog poliproteina s proteinom Gag, koji predstavlja osnovnu građevnu jedinicu VLP-a.

Svaki retroelement koristi točno određenu molekulu tRNA domaćina kao početnicu u reverznoj transkripciji. To znači da mora postojati mehanizam kojim se upravo te molekule izdvajaju iz citoplazme i pakiraju u VLP. Za neke retroviruse utvrđeno je da reverzna transkriptaza ima važnu ulogu u pakiranju tRNA-početnice, a do međudjelovanja između reverzne transkriptaze i tRNA dolazi u području antikodonske omče (retrovirus HIV-1), sparivanjem baza između PBS-a RNA kalupa i CCA-kraja molekule tRNA (Ty1 retrotranspozon), ili između nekoliko kratkih regija 3' od PBS-a RNA kalupa i DHU- i TΨC-omče molekule tRNA (Jelenić, 1997.).

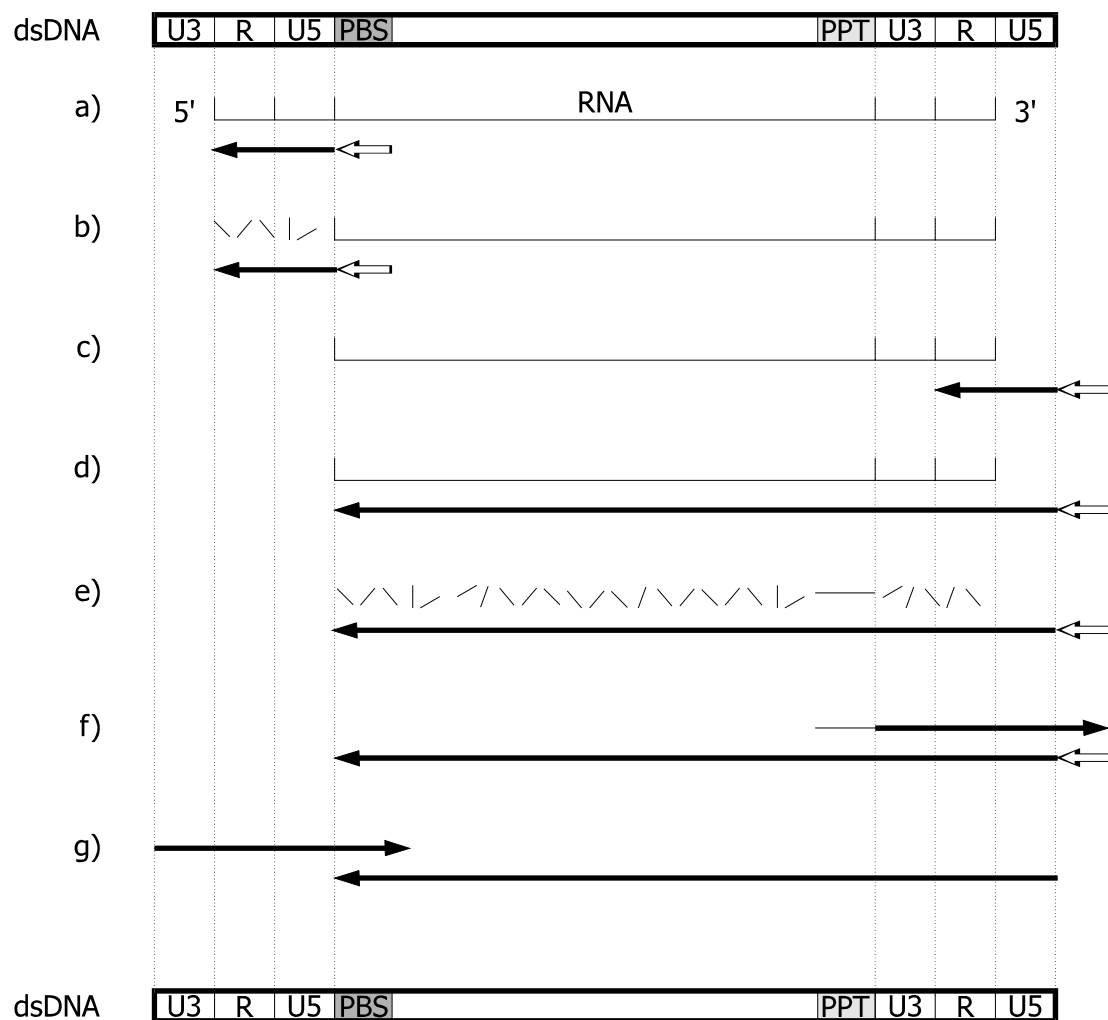
1.1.1.3. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija se odvija u VLP-ima, u citoplazmi. Budući da je enzim reverzna transkriptaza (RT) sastavni dio poliproteina Gag-Pol, funkcionalni enzim se oslobađa proteolitičkim djelovanjem proteaze (PR), koja je i sama dio istog poliproteina. Proteaze svih poznatih retrovirusa i retrotranspozona sadrže u aktivnom

mjestu aminokiselinski triplet Asp-Thr/Ser-Gly i djeluju u obliku dimera, za razliku od srodnih staničnih enzima. Ciljna mjesta djelovanja proteaze nemaju jedinstvenu sekvencu, pa ne možemo predvidjeti gdje će proteaza djelovati. Osim oslobađanja funkcionalnih enzima (INT i RT/RH) iz poliproteina Gag-Pol, proteaza modificira i protein Gag tijekom oblikovanja VLP-a (Katz i Skalka, 1994.). Kod reverznih transkriptaza svih poznatih retrotranspozona i retrovirusa nađena je konzervirana sekvenca Tyr-X-Asp-Asp, karakteristična za sve polimeraze. Budući da je u svih istraženih reverznih transkriptaza ribonukleaza H sastavni dio enzima, reverzna transkriptaza sadrži sve tri funkcije nužne za sintezu novih kopija retroelementa: RNA-ovisna DNA polimeraza, ribonukleaza H i DNA-ovisna DNA polimeraza (Katz i Skalka, 1994.).

Mjesto na mRNA na koje se veže početnica za reverznu transkripciju, komplementarno je 3'-kraju određene stanične tRNA. Reverzna transkriptaza koristi taj 3'-kraj kao početnicu za sintezu dijela DNA komplementarnog R i U5 slijedu 5'-LTR-a (Slika 3a). Reverzna transkriptaza ne može sintetizirati daljnju DNA, jer je došla do kraja kalupa, do 5'-kraja retrotranspozonske mRNA. RNaza H tada cijepa RNA iz RNA:DNA hibrida, oslobađajući jednolančanu DNA komplementarnu R sekvenci na 3'-kraju mRNA retrotranspozona (Slika 3b). Oslobođeni dio lanca DNA se premješta na 3'-kraj mRNA retrotranspozona, pri čemu se nastavlja sinteza komplementarnog lanca DNA (Slika 3c). Budući da se u VLP-u nalaze barem dvije molekule RNA (kalupi), taj fragment DNA se može premjestiti i na 3'-kraj drugog kalupa. Hibridizacijom tih dviju sekvenci nastaje kružna struktura (nije prikazano) koja omogućuje kontinuiranu reverznu transkripciju do potpune sinteze jednolančanog DNA oblika retrotranspozona (Slika 3d). Sinteza drugog lanca DNA zahtijeva djelovanje RNaze H i polipurinski slijed (PPT) s 5'-strane 3'-LTRa (Slika 3e). Polipurinski slijed u RNA otporan je, iz još nepoznatih razloga, na ribonukleaznu aktivnost reverzne transkriptaze i služi kao početnica za sintezu drugog DNA-lanca na kalupu prvog (Slika 3f). Sinteza dijela drugog lanca DNA završava kada reverzna transkriptaza prepíše dio molekule tRNA (početnice) komplementaran PBS-u. Nakon sinteze ovog dijela drugog lanca, početnica se odvaja od prvog lanca DNA. Slijedi drugo premještanje tijekom kojeg se sintetizirani dio drugog lanca premješta na 3'-kraj prvog lanca DNA, gdje dolazi do sparivanja baza u regiji PBS (Slika 3g).

Reverzna transkriptaza tada završava sintezu oba lanca, stvarajući dvolančanu DNA kopiju retroelementa (Kumar i Bennetzen, 1999.).



Slika 3. Shematski prikaz reverzne transkripcije retrovirusa. Bijela strelica predstavlja molekulu tRNA (početnicu); dsDNA je dvolančana DNA molekula; jednolančane molekule DNA prikazane su strelicama, koje ujedno označavaju smjer sinteze. (Jelenić, 1997.)

1.1.1.4. Integracija

Reverznom transkripcijom sintetizirana dvolančana DNA ugrađuje se u stanični genom pomoću integraze, koja posjeduje endonukleaznu aktivnost i siječe i donorsku i domaćinsku DNA molekulu. Nije poznato ulaze li u jezgru VLP-i ili samo nukleoproteinski kompleks koji mora sadržavati DNA-kopiju elementa i enzim

integrazu. N-kraj integraze sadrži strukturu HHCC, tzv. “zink finger” regiju odgovornu za vezanje DNA, središnja katalitička domena je konzervirana struktura D,D(35)E, esencijalna za funkcionalnost enzima, a C-terminalni dio je vrlo heterogen i utvrđeno je da bi mogao imati ulogu u odabiru mjesta integracije. Kako svi retroelementi sadrže na 5'-kraju dinukleotid TG, a na 3'-kraju CA, smatra se da su to dijelovi prema kojima integraza prepoznaje supstrat ugradnje.

Vezujuće mjesto za početnicu (PBS) i polipurinski niz (PPT) služe kao inicijacijska mjesta za sintezu minus i plus lanca DNA i odvojeni su najčešće s dva nukleotida od 5'- i 3'-LTR-a. Zbog toga ekstrakromosomska linearna DNA retroelementa ima dva para baza viška u odnosu na ugrađenu kopiju. Prije ugradnje u genom domaćina, još u citoplazmi u VLP-ima, ti dodatni nukleotidi se uklanjaju (Feuerbach i sur., 1997.). Nakon procesiranja, hidroksilne grupe na 3'-krajevima elementa spremne su za nukleofilni napad na fosfate u DNA-lancima domaćina (Plasterk, 1993., Schnable i sur., 1998.). Integraza zasijeće DNA u obliku 3 do 5 pb dugog zareza, stvarajući duplikaciju 3 do 5 pb u izravnoj orijentaciji oko ugrađenog retrotranspozona. Dužina duplikacija koje element uzrokuje svojom ugradnjom karakteristična je za svaki retroelement. Preferirana mjesta ugradnje su u nekim slučajevima aktivno transkribirane kromosomske regije, uglavnom u promotorima ili u njihovoj blizini, dok su u drugim slučajevima to ponavljajuće heterokromatinske regije. Retrotranspozoni kvasca Ty1, Ty2 i Ty3 ugrađuju se uglavnom uzvodno od gena koje prepisuje RNA polimeraza III, uključujući tRNA, 5S i U6 gene, dok se Ty5 ugrađuje u utišane, transkripcijski neaktivne regije kromosoma (Kumar i Bennetzen, 1999.). Nije potpuno poznato na koji se način odvija odabir mjesta ugradnje, no zna se da to čini tzv. integracijski kompleks, sastavljen od integraze, cDNA retrotranspozona i različitih faktora domaćina (Kumar i Bennetzen, 1999.).

1.2. LTR-RETROTRANSPOZONI BILJAKA

Ty1-*copia* retrotranspozoni čine najveću grupu retrotranspozona biljaka (Wang i sur., 1997., Wang i sur. 1999.). Retrotranspozoni grupe Ty1-*copia* i Ty3-*gypsy* utvrđeni su u cijelom biljnom carstvu, od jednostaničnih algi do mahovina, golosjemenjača i

kritosjemenjača (Brandes i sur., 1997., Flavell i sur., 1995., Kumar, 1996.). Obje grupe retrotranspozona često se nalaze u velikom broju, do nekoliko milijuna kopija po haploidnoj jezgri u biljkama s velikim genomima, kao što je bob *Vicia faba* (Pearce i sur., 1996.), i često čine 10–50% biljnog genoma (Kubis i sur., 1998.). Postoji vrlo velika raznolikost u retrotranspozonskom sastavu i unutar same biljke i između biljnih vrsta. U biljnom genomu prisutni su LTR- i ne-LTR retrotranspozoni, uključujući Ty1-*copia* i Ty3-*gypsy* grupe, LINE i SINE (Tablica 1) (Grandbastien, 1998., Kumar i Bennetzen, 1999., Kumar i sur., 1997., Kunze i sur., 1997., Wang i sur., 1997.). U mnogo slučajeva, Ty1-*copia* i Ty3-*gypsy* retrotranspozoni razasuti su po svim kromosomima. Ipak, svaka grupa retrotranspozona ima porodice koje preferiraju specifične regije kromosoma. *In situ* hibridizacija metafaznih kromosoma i profaznih jezgri pokazala je da se sekvence retrotranspozona Ty1-*copia* uglavnom nalaze raspršene u eukromatinskim regijama, jednoliko ili nejednoliko, ovisno o biljnoj vrsti i pojedinom elementu (Garber i sur., 1999., Hirochika i sur., 1996., Yamazaki i sur., 2001.). U nekih eukariotskih organizama, centromere, telomere i druge heterokromatinske regije kromosoma bogate su retrotranspozonomima (Okamoto i Hirochika, 2000.). Ty3-*gypsy* retrotranspozoni nađeni su u centromernim regijama kukuruza, raži i pšenice, dok su neki Ty1-*copia* retrotranspozoni prisutni u terminalnim heterokromatinskim regijama kromosoma luka (*Allium cepa*), a nisu prisutni u istim regijama kod raži (*Secale cereale*) (Kumar i Bennetzen, 1999.). Kod biljaka, većina retrotranspozona nađena je u eukromatinskim međugenskim regijama (Kumar i Bennetzen, 1999., SanMiguel i Bennetzen, 1998., SanMiguel i sur., 1996., Yamazaki i sur., 2001.). Evolucijski su vrlo značajni oni retrotranspozoni koji su se ugrađivali primarno u relativno inaktivne regije biljnih kromosoma, kao što su međugenske regije i repetitivne sekvence, da izbjegnu visoku učestalost mutacija gena (Kumar i Bennetzen, 1999., SanMiguel i sur., 1996.). Na taj način se retrotranspozoni mogu umnažati bez štete za domaćina i povećati veličinu njegovog genoma.

Iako su retrotranspozoni prisutni u cijelom biljnom carstvu i to u velikom broju kopija, osobito u velikim genomima, samo mali dio njih je aktivan (Kumar i Hirochika, 2001.). Inaktivnost je većinom posljedica defektnih struktura uzrokovanih točkastim mutacijama i delecijama, ili odsustva transkripcije (Yamazaki i sur., 2001.). Istraživanjem transpozicije u originalnom i heterolognom domaćinu, do danas su utvrđena samo tri retrotranspozona Ty1-*copia* skupine koji su aktivni u biljnim

genomima: Tnt1 (Courtial i sur., 2001., Grandbastien i sur., 1989., Lucas i sur., 1995.) i Tto1 (Okamoto i Hirochika, 2000.) iz duhana, te Tos17 iz riže (Hirochika, 1997., Hirochika, 2001., Yamazaki i sur., 2001.). Proces transpozicije i transkripcije ovih retrotranspozona također je utišan u normalnim uvjetima rasta i razvoja organizma, no inducira se u različitim stresnim uvjetima.

Tablica 1. Svojstva nekih biljnih retrotranspozona. (Feschotte i sur., 2002., Kumar i Bennetzen, 1999.)

	Naziv	Biljna vrsta	Veličina /kpb	Dužina LTR-a/pb	Broj kopija	Lokacija
LTR retrotranspozoni						
Ty1-copia	BARE-1	Ječam	12,1	1829	>50000	Raspršeno
	Opie-1	Kukuruz	8,7	1256	>30000	Raspršeno između gena
	PREM-2	Kukuruz	9,5	1307	>10000	Raspršeno
	Tnt1	Duhan	5,3	610	>100	Raspršeno u eukromatinu
	Tos17	Riža	4,1	138	1-5 (30)	Raspršeno
	Tto1	Duhan	5,3	574	>30 (300)	Raspršeno
Ty3-gypsy	Athila	Uročnjak	10,5	1539	30	Paracentromerne regije
	Cereba	Ječam	~10	-	1500	Centromer
	Cyclops-2	Grašak	~12	1504	1000	Raspršeno
	Zeon-1	Kukuruz	7,3	648	>1250	Nema podataka
Ne-LTR retrotranspozoni						
LINE	Cin4	Kukuruz	1-6,8	-	50-100	Nema podataka
	Del2	Ljiljan	4,5	-	250000	Raspršeno
	Tal1	Uročnjak	6,1	-	1-6	Raspršeno
SINE	TS	Duhan	0,111	-	>50000	Raspršeno
	S1	Koraba	0,170	-	500	Raspršeno

1.2.1. Regulacija aktivnosti LTR-retrotranspozona u biljaka

Evolucija kontrolnih mehanizama transkripcije i transpozicije retrotranspozona ključna je za smanjenje njihovih mogućih štetnih učinaka na genom domaćina. Zbog toga su biljni retrotranspozoni transkripcijski utišani u većini tkiva tijekom rasta i razvoja biljke (Okamoto i Hirochika, 2001.). Kako se retrotranspozoni ne mogu premješati bez prisutnosti RNA-kalupa potrebnog za reverznu transkripciju, najjednostavniji način kontrole njihove aktivnosti bila bi regulacija inicijacije transkripcije. Odnos između transkripcije i transpozicije retrotranspozona proučavan je na retrotranspozonu duhana Tto1 i retrotranspozonu riže Tos17. Povećanje njihove

transpozicije bilo je proporcionalno povećanju količine njihove RNA, što pokazuje da je transpozicija regulirana uglavnom na transkripcijskoj razini (Hirochika, 1993., Hirochika i sur., 1996.). No, ista situacija se nije ponovila kod retrotranspozona ječma BARE-1, što znači da, iako je transkripcija ključna za transpoziciju elementa, postoje i drugi mehanizmi regulacije, kao što je npr. posttranskripcijska regulacija.

Svi poznati aktivni biljni retrotranspozoni su utišani tijekom razvoja, a transkripcijski se aktiviraju različitim biotičkim i abiotičkim činiteljima stresa (Wessler, 1996.). Ekspresija retrotranspozona duhana Tnt1 i Tto1 se znatno povećala primjenom nekih abiotičkih stresora, kao što su izolacija protoplasta, kultura stanica i tkiva, ranjavanje, primjena metil-jasmonata, CuCl₂ i salicilne kiseline (Hirochika, 1993., Pouteau i sur., 1994., Sugimoto i sur., 2000., Takeda i sur., 1998., Takeda i sur., 1999.). Isto tako, različiti biotički faktori, kao što je ekstrakt gljivice *Trichoderma viridae* (Takeda i sur., 1999.) ili inokulacija različitih virusnih, bakterijskih ili gljivičnih patogena (Mhiri i sur., 1999., Pouteau i sur., 1994.) aktiviraju transkripciju istih retrotranspozona. Za razliku od Tnt1 i Tto1, jedini za sada poznati čimbenik koji aktivira retrotranspozon Tos17 je kultura tkiva. Ovi rezultati ukazuju na postojanje *cis*-djelujućih sekvenci u retrotranspozonima, koje kontroliraju njihovu ekspresiju u domaćinu. Aktivacija retroelemenata tijekom kulture stanica i tkiva mogla bi biti odgovorna za “somaklonsku varijabilnost”, visoku učestalost mutacija u biljaka regeneriranih u kulturi tkiva, u onih biljnih vrsta koje sadrže potencijalno aktivne retrotranspozone (Wessler, 1996.).

Stanice domaćina, a vjerojatno i sami retrotranspozoni, razvili su mehanizme za smanjivanje negativnih učinaka umnažanja retrotranspozona u genomu (Feschotte i sur., 2002.). Pretpostavlja se da se metilacija DNA razvila da ograniči umnažanje sekvenci pokretnih genetičkih elemenata i virusa u domaćinskom genomu (Kumar i Bennetzen, 1999.). Analiza repetitivne DNA u biljaka pokazala je da su one metilirane na citozinu u sekvencama 5'-CG-3' i 5'-CNG-3' (Okamoto i Hirochika, 2001.). Metilacija citozina vezana je uz genetičku inaktivaciju i heterokromatinsko stanje kod mnogih viših eukariota, uključujući biljke, gdje je *de novo* metilacija prvi puta otkrivena tijekom inaktivacije DNA-transpozona *Mutator* i *Ac/Ds* porodica (Kumar i Bennetzen, 1999., Kunze i sur., 1997.). Metilacija citozina vezana je, osim uz transkripcijsku inaktivaciju, i uz veću učestalost tranzicija C – T, povećavajući na

taj način efekt transkripcijskog i mutacijskog utišavanja (Okamoto i Hirochika, 2001., SanMiguel i Bennetzen, 1998.). No, danas je još nepoznato da li metilacija sama uspostavlja inaktivno stanje retrotranspozona, ili se javlja sekundarno, nakon inaktivacije uzrokovane promjenom strukture kromatina i služi tek za održavanje utišanog stanja. Proučavanja retrotranspozona Tto1 pokazala su da, nakon početne aktivne transpozicije u genomu uročnjaka, on postaje utišan. Utišavanje se očitovalo kroz smanjen broj transkripata Tto1 i metilaciju retrotranspozona. Uvođenjem hipometilacijske mutacije *ddm1* u linije s utišanim Tto1 obnovljena je njegova aktivnost (Hirochika i sur., 2000., Okamoto i Hirochika, 2001.). Spomenuti rezultati pokazuju da je metilacija vjerojatno odgovorna za utišavanje aktivnosti retrotranspozona Tto1 u uročnjaku. No, kako kod organizama *Drosophila melanogaster* i *Saccharomyces cerevisiae* nije pronađena metilacija citozina (Kumar i Bennetzen, 1999.), već ulogu u utišavanju ima isključivo kromatin, vjerojatno metilacija nije nužna za genetičko utišavanje, već su inaktivna heterokromatinska struktura i deacilacija histona vjerojatno univerzalne za sve eukariote (Okamoto i Hirochika, 2001.).

Epigenetička inaktivacija elementa može biti posljedica ugradnje u heterokromatinski blok DNA ili u njegovu blizinu, kao što je to slučaj kod nekih retrotranspozona kukuruza (Kumar i Bennetzen, 1999., SanMiguel i Bennetzen, 1998., SanMiguel i sur., 1996.). U tom slučaju premještanje eukromatinskih gena u heterokromatinsku regiju dovodi do progresivnog širenja utišanog heterokromatinskog stanja na translocirane gene. Poznat je i slučaj tzv. paramutacije, koordinativne inaktivacije iste porodice transpozona (Kumar i Bennetzen, 1999., Okamoto i Hirochika, 2001.).

1.2.2. Retrotranspozoni u genomu uročnjaka *Arabidopsis thaliana*

Uročnjak *Arabidopsis thaliana* je manje važna korovna vrsta iz porodice *Brassicaceae*, široko rasprostranjena po Europi, Aziji i Sjevernoj Americi. Vrlo je pogodan za genetička istraživanja, jer ima najmanji genom među višim biljem, čija je sekvenca u potpunosti poznata, kratko generacijsko vrijeme (6 tjedana od sjemena do sjemena) i svaka biljka daje više od 5000 sjemenki. Cvjetovi se najčešće

samooprašuju, a sjeme iskljuje u rozetaste biljke promjera 2 do 10 cm, visoke najviše 15-20 cm, ovisno o ekotipu i uvjetima uzgoja (Meinke i sur., 1998.).

Genom uročnjaka ima vrlo malo nekodirajućih regija, u prosjeku na svakih 5 kb dolazi jedan gen. Oko polovice tih gena su visoko srodni s genima nađenim u drugim organizmima, od bakterija do čovjeka. Suprotno od kukuruza, gdje postoje tisuće različitih porodica LTR- i ne-LTR-retrotranspozona, koje čine čak 70-85% jezgrinog genoma (Yamazaki i sur., 2001.), uročnjak ima relativno malu količinu raspršene ponavljajuće DNA (~25%) (Meinke i sur., 1998., Thompson i sur., 1996.). Sekvenciranje 80-90% genoma biljke *A. thaliana*, koje ne uključuje centromerni heterokromatin, telomere ili satelitska ponavljanja, pokazalo je relativno malu gustoću i jednostavnu organizaciju ponavljajuće DNA. U svakih oko 130 kb genoma uročnjaka nađen je retrotranspozon. Kako je genom uročnjaka velik oko 130 Mpb to znači da u cijelom genomu možemo naći oko tisuću retroelemenata, koji zauzimaju oko 4% genoma. Retrotranspozoni koncentrirani u centromernim regijama čine dodatnih 4-6% genoma. Također, retrotranspozoni čine oko 4% mitohondrijskog genoma ove biljke (Kumar i Bennetzen, 1999., Okamoto i Hirochika, 2000.). U genomu *A. thaliana* nađeni su i LTR- i ne-LTR-retrotranspozoni, uključujući Ty1-*copia*, Ty3-*gypsy* i LINE elemente, koji su vrlo raznoliki, no prisutni u malom broju kopija, 20-300, ovisno o retroelementu (Thompson i sur., 1996.), i čine 4-10% ukupne jezgrine DNA. Porodica *Ta* retrotranspozona uročnjaka zastupljena je s 15 (Konieczny i sur., 1991., Voytas i sur., 1990.), a porodica *Athila* sastavni je dio pericentromernih satelitskih ponavljanja s oko 150 kopija (Thompson i sur., 1996.). Filogenetička istraživanja ukazuju na činjenicu da je horizontalni prijenos imao značajnu ulogu u evoluciji Ty1-*copia* retrotranspozona vrste *A. thaliana* (Konieczny i sur., 1991.). Retrotranspozoni uročnjaka su uglavnom neaktivni i prisutni u malom broju kopija. Pretpostavlja se da su u prošlosti proliferirali, no da je tijekom evolucije smanjen broj kopija (Wright i sur., 1996.), ili da je uročnjak postepeno razvio obrambene mehanizme protiv njihova umnažanja (Lucas i sur., 1995.).

1.2.3. Porijeklo i evolucija biljnih retrotranspozona

Na temelju usporedbe sekvenci konzerviranih genskih produkata LINE i LTR-retrotranspozona smatra se da su LINE bili prvi retrotranspozoni, a LTR-retrotranspozoni su se razvili iz njih, dobivši LTR-ove (Kumar i Bennetzen, 1999.). Retrovirusi su se vjerojatno razvili u životinja iz retrotranspozona skupine Ty3-*gypsy*, dobivši gen za infektivnu ovojnica (Kumar i Bennetzen, 1999.). Postoje i neke pretpostavke da su retrotranspozoni nastali na početku prijelaza s RNA staničnog genoma na stabilniji dvolančani DNA sistem (Kumar i Bennetzen, 1999.). Raširenost biljnih retrotranspozona i njihova velika raznolikost upućuju na mogućnost njihove prisutnosti u prvim biljkama (Flavell i sur., 1992., Kumar i sur., 1997., Voytas i sur., 1992.), no oni su mogli nastati i nakon razvoja prvih eukariota i postići današnju raznolikost kombinacijom vertikalnog i horizontalnog prijenosa (Flavell i sur., 1995., Hirochika i Hirochika, 1993., Plasterk, 1993.). Selektivni pritisak je vjerojatno djelovao u smjeru korištenja retrotranspozonskih sekvenci za dobrobit cijelog organizma, ako se neka prednost mogla razviti putem mutacijskih promjena. Doprinos tih elemenata promotorima mnogih biljnih gena već je uočen (White i sur., 1994.). PCR analize korištene u proučavanju insercijskih polimorfizama pokazale su veliku polimorfnost biljnih retrotranspozona grupe Ty1-*copia* (Flavell i sur., 1992., Konieczny i sur., 1991., Voytas i sur., 1992.), što govori da je ta grupa transpozona transpozicijski aktivna već milijune godina. Transpozicijska aktivnost biljnih retrotranspozona značajno varira na evolucijskoj vremenskoj ljestvici, tako da su neki retrotranspozoni bili aktivni u dalekoj prošlosti, dok su drugi aktivni tek odnedavno. Većina retrotranspozona kukuruza premještala se unutar zadnjih 2-6 milijuna godina (SanMiguel i Bennetzen, 1998.), što je zapaženo proučavanjem stupnja mutacija u LTR-sekvencama nekoliko retrotranspozona. Naime, LTR-sekvence se sintetiziraju sa zajedničkog kalupa tijekom replikacijskog ciklusa retrotranspozona i stoga su 5'-LTR i 3'-LTR identični prilikom ugradnje u genom. S vremenom se u svakoj od tih sekvenci nakupljaju različite mutacije, pa procjenjujući razliku u sekvenci između dva LTR-a, uz pretpostavku konstantnog stupnja nukleotidne supstitucije, možemo saznati kada se retrotranspozon ugradio na proučavano mjesto.

Većina biljnih retrotranspozona ima defektne strukture, koje su uglavnom posljedica velikih unutarnjih insercija ili delecija (Kumar i Bennetzen, 1999.), pomaka okvira čitanja i stop-kodona (Hirochika i Hirochika, 1993.). No, unatoč tome, mnogi defektni retrotranspozoni ostaju u genomu, pa se čak i umnažaju. Mnogima nedostaju funkcionalne regije (*pol*), pa enzime potrebne za transpoziciju koriste *in-trans*, posuđujući ih od nekog drugog retrotranspozona (Hirochika i sur., 1996., Kumar i Bennetzen, 1999.). Spomenute unutarnje mutacije mogu dovesti do novih osobitosti retrotranspozona ili novih prednosti za domaćinski genom. Tako može doći do promjene tkivne specifičnosti promotora i time nagle aktivacije retrotranspozona u određenoj stanici.

1.2.3.1. Učinak retrotranspozona na evoluciju biljnih gena i genoma

Osim što sami mutiraju, retrotranspozoni utječu i na mutacije gena domaćina, veličinu genoma i genske rearanžmane (Kumar i Bennetzen, 1999., Voytas i sur., 1990., Yamazaki i sur., 2001.). Ugradnja retrotranspozona u blizinu ili u same gene uzrokuje promjenjenju ekspresiju gena (Feschotte i sur., 2002.), najčešće smanjenje ili potpuni prekid transkripcije, ili utječe na procesiranje transkripta i stabilnost produkta. Mnogi divlji tipovi gena sadrže tragove davne retrotranspozonske insercije (Wessler i sur., 1995., White i sur., 1994.), i to uglavnom unutar regulatornih i/ili strukturnih sekvenci. Promotori smješteni u LTR sekvencama LTR-retrotranspozona mogu uzrokovati promjenu ekspresije gena (Wessler i sur., 1995.). Nakon insercije u blizinu gena ili u sam gen, retrotranspozon je selektiran prema mogućem pozitivnom učinku na funkciju tog gena. Tako su retrotranspozoni koji uzrokuju insercijske mutacije nađeni u vrlo malom broju kopija u biljnom genomu, dok su oni koji ne uzrokuju značajne mutacije, u međugenskim regijama, prisutni i u više od 10000 kopija. To ukazuje na usku vezu između štetnosti po genom i broja kopija (SanMiguel i sur., 1996.).

Retrotranspozoni igraju značajnu ulogu u veličini biljnog genoma. Mali genomi, kao što je genom uročnjaka *Arabidopsis thaliana* (1C=130Mpb) vjerojatno su posljedica izostanka proliferacije retrotranspozona (Wright i sur., 1996.), dok su veliki genomi boba *Vicia faba* (1C=128000Mpb) i kukuruza *Zea mays* (1C=3200Mpb) vjerojatno

posljedica uspješne kolonizacije i umnažanja retrotranspozona (Pearce i sur., 1996.). Ukupan broj svih transpozona kukuruza se kreće oko 300000, što čini oko 50-80% jezgrina genoma (SanMiguel i Bennetzen, 1998.). Iako su retrotranspozoni odigrali važnu ulogu u ekspanziji biljnih genoma (Kumar, 1996., SanMiguel i Bennetzen, 1998.), mnogi su bili eliminirani različitim mehanizmima, kao što je homologna rekombinacija između LTR-ova istog retrotranspozona, pri čemu se retrotranspon izreže iz genoma ostavljajući jedan LTR za sobom (Kumar i Bennetzen, 1999., SanMiguel i sur., 1996.) te drugi tipovi delecija.

Retrotranspozoni mogu i rearanžirati genom. Dešava se da normalna stanična mRNA bude prepisana pomoću reverzne transkriptaze i ugrađena u genom pomoću integraze retrotranspozona. Na taj način u biljkama nastaju pseudogeni bez introna, koji mogu poslužiti kao temelj za evoluciju novih gena (Kumar i Bennetzen, 1999.). Zbog njihovog velikog broja i raspršenosti po genomu, retrotranspozoni mogu biti mjesta ektopičke rekombinacije. Kod ektopičke rekombinacije dolazi do rekombinacije između dva retrotranspozona iste porodice. Ako se retrotranspozoni nalaze u direktnoj orijentaciji na istom kromosomu, mogu uzrokovati recipročne duplikacije i delecije, a na različitim kromosomima recipročne translokacije. Nejednolika rekombinacija između dva elementa na istom kromosomu u suprotnim orijentacijama uzrokuje inverziju sekvenci između dva retrotranspozona, što je primijećeno kod vinske mušice i kvasca (Kumar i Bennetzen, 1999.).

1.2.4. Retrotranspozoni kao genetički biljezi

Velika prednost retrotranspozona je njihova raširenost, veliki broj kopija, vrlo raznolike populacije i raspršenost po kromosomima (Kumar i sur., 1997., Okamoto i Hirochika, 2000.). Aktivni retrotranspozoni stvaraju nove insercije u genomu, stvarajući polimorfizme, koji se mogu detektirati i pomoći u uspostavljanju filogenetskih odnosa. Za procjenu filogenetskih odnosa unutar i između biljnih vrsta koristi se multi-retrotranspozonski sustav. Naime, svaki element ima jedinstvenu transpozicijsku povijest. Tako su npr. retroelementi koji su se premiještali u bliskoj prošlosti izuzetno polimorfni unutar vrste, dok su oni aktivni pred milijune godina prikladni za determinaciju odnosa između vrsta i među rodovima (Kumar i Hirochika,

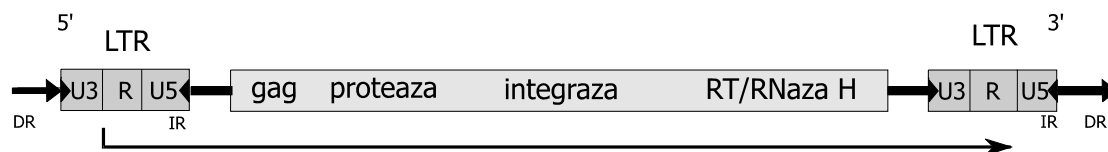
2001.). Retrotranspozoni se u tu svrhu koriste u proučavanju bioraznolikosti mnogih vrsta (Hirochika i Hirochika, 1993.). Zbog rasprostranjenosti mnogih retrotranspozona po eukromatinskim regijama kromosoma, moguće ih je koristiti kao biljege vezane za agronomski važne gene. Tako retrotranspozon Tnd-1 služi kao biljeg vezan uz otpornost na crni korijen kod duhana (Kumar i Bennetzen, 1999.).

Neki retrotranspozoni su idealni za “gene tagging” kod biljaka, što uključuje (a) retrotranspozonom potpomognute stabilne insercijske mutacije, (b) mogućnost stvaranja velike količine nasumičnih insercija za “zasićenu” mutagenezu, (c) transpoziciju koja može biti regulirana abiotičkim i biotičkim stresom, (d) visoku mutagenost zbog česte ugradnje u gene, (e) mali broj kopija, što olakšava identifikaciju retrotranspozonskih insercija odgovornih za specifičnu mutaciju, i (f) endogene retrotranspozone koji su zastupljeni u biljkama i mogu biti aktivni u mnogim vrstama (Hanin i sur., 2001., Hirochika, 1995., Hirochika, 1997., Kumar i Hirochika, 2001.). Sve navedene uvjete ispunjava retrotranspozon riže Tos17, pomoću kojeg je napravljena velika kolekcija nasumičnih insercija za “zasićenu” mutagenezu, a korišten je i za kloniranje mnogih gena riže (Hirochika, 1997., Hirochika, 2001., Okamoto i Hirochika, 2000., Wang i sur., 1999.).

1.3. RETROTRANSPOZON Tpv2

Porodica retrotranspozona Tpv2 otkrivena je 1999. godine u genomu graha, *Phaseolus vulgaris*, i pripada grupi LTR-retrotranspozona Ty1-*copia* (Garber i sur., 1999.). Retrotranspozon Tpv2 velik je 5379 pb i, kao i većina pripadnika grupe Ty1-*copia* retrotranspozona u biljaka, sadrži jedinstveni otvoreni okvir čitanja. Otvoreni okvir čitanja sadrži regije koje kodiraju Gag (strukturni protein), proteazu, integrazu, reverznu transkriptazu i RNazu H (Slika 4). PBS minus-lanca DNA nalazi se nizvodno od 5'-LTR-a i odvojeno je od njega 3 pb dugom razmaknicom sekvence ATT. PPT je heptapurinska sekvenca (GGGGGAG) i odijeljena je od 3'-LTR-a razmaknicom TTT. Kao kod većine retrotranspozona, -PBS-sekvencija je komplementarna inicijatorskoj Met-tRNA, početnici za reverznu transkripciju.

Od četrdesetak kopija retrotranspozona Tpv2, korištenjem RT-PCR-a (“reverse transcriptase PCR”) i analizom genomskih klonova detaljno su proučene 4 kopije.



Slika 4. Shematski prikaz retrotranspozona Tpv2. Označeni su IR - obrnuta ponavljanja; DR - izravna ponavljanja; strelica označava duljinu prepisane mRNA.

Otkriveno je da se Tpv2 ugrađuje prvenstveno u aktivno transkribirane regije kromosoma, u same gene, ili u njihovu blizinu, ostavljajući na mjestu ugradnje duplikacije velike 5 pb. Genetički lokusi koji omeđuju ugrađene kopije retrotranspozona Tpv2 odlične su probe u proučavanju raznolikosti između genotipova graha. Iako niti jedan od izoliranih elemenata nije imao sve funkcionalne regije potrebne za transpoziciju, analize kultivara graha pokazale su da su se neki članovi porodice Tpv2 premještali u nedalekoj uzgojnoj prošlosti (Garber i sur., 1999.). Uzrok inaktivnosti svakog od proučavanih retrotranspozona Tpv2 bila je mutacija u otvorenom okviru čitanja, bilo stop-kodon u domeni integraze, delecija dijela integraze, ili “frame-shift” mutacija.

Transkripcija retrotranspozona Tpv2 nije utvrđena u lišću biljaka uzgojenih u stakleniku, no listovi tretirani UV-svjetlom obilovali su RNA-transkriptima koji su hibridizirali s Tpv2-probom. Aktivacija retrotranspozona Tpv2 uočena je i u uvjetima stresa uzrokovanog salicilnom kiselinom ili inokulacijom biljnog patogena, bakterije *Pseudomonas syringae* (Garber i sur., 1999.). Ovi rezultati slažu se s činjenicom da mnogi biljni retrotranspozoni sadrže promotore koji se aktiviraju čimbenicima stresa.

Kako nijedan od četiri izolirana elementa nije imao sve funkcionalne domene potrebne za transpoziciju, konstruiran je potencijalno aktivan hibridni retrotranspozon Tpv2, na temelju sadašnjeg znanja o regijama ključnim za aktivnost LTR-retrotranspozona (Andreas Bachmair, neobjavljeno).

1.4. OBRAZLOŽENJE TEME I CILJ RADA

LTR-retrotranspozoni utvrđeni su u genomima svih do sada istraživanih biljnih vrsta (Brandes i sur., 1997., Flavell i sur., 1992., Kumar, 1996., Kumar i Bennetzen, 1999., Voytas i sur., 1992.). Broj kopija pojedinog retroelementa u genomu varira od nekoliko pa do više milijuna, ovisno o elementu i biljnoj vrsti (Kumar i Bennetzen, 1999.). Unatoč velikom broju utvrđenih porodica LTR-retrotranspozona, izolirana su samo tri aktivna elementa: Tnt1 i Tto1 iz duhana, te Tos17 iz riže (Grandbastien i sur., 1989., Okamoto i Hirochika, 2000., Hirochika, 1997.). Budući da postoji još uvijek slabo okarakteriziran mehanizam kojim domaćin regulira broj kopija pojedinog elementa u genomu, retrotranspozone se nastoji prebaciti u genom drugog domaćina radi proučavanja aktivnosti i životnog ciklusa. Redovito se kao alternativni domaćin odabire uročnjak *A. thaliana*, jer je uročnjak modelni organizam i ne sadrži aktivne LTR-retrotranspozone. Tako je, na primjer, retrotranspozon Tnt1 uspješno aktiviran u stanicama uročnjaka ekotipa C24, a Tto1 u ekotipu WS (Lucas i sur., 1995., Okamoto i Hirochika, 2000.). Tijekom proučavanja aktivnosti retrotranspozona Tto1 u ekotipu Col-O, utvrđena je visoka učestalost homologne rekombinacije između LTR-ova potencijalno aktivnih elemenata, dok su mutirani elementi bili stabilno ugrađeni u genom (Jelenić, 1997).

Retrotranspozon Tpv2 izoliran je iz genoma graha (Garber i sur., 1999.). Detaljno je proanalizirano nekoliko kopija tog elementa i u svih kopija su utvrđene različite mutacije (Garber i sur., 1999.). Kombinacijom dijelova dviju nefunkcionalnih kopija sastavljen je potencijalno funkcionalan hibridni retrotranspozon (A. Bachmair, neobjavljeno).

Cilj ovog rada bio je ugradnja hibridnog retrotranspozona Tpv2 u genom uročnjaka radi proučavanja njegove aktivnosti. U svrhu olakšanog praćenja aktivnosti korišten je i hibridni retrotranspozon s ugrađenim intronom. Budući da se retrotranspozoni umnažaju reverznom transkripcijom, nove kopije ne sadrže intron, te ih je lako utvrditi primjenom PCR-a.

U okviru rada željelo se, također, istražiti ponaša li se Tpv2 u različitim ekotipovima uročnjaka slično retrotranspozonu Tto1. Retrotranspozon Tto1 je aktivan u ekotipu

WS, dok se u ekotipu Col-O sve funkcionalne kopije izrezuju iz genoma homolognom rekombinacijom. Stoga je Tpv2 ugrađen u genom ekotipova WS i Col-O.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Organizmi

2.1.1.1. Biljka uročnjak *Arabidopsis thaliana*

U pokusima su korišteni ekotipovi Wassilevskia (WS) i Columbia (Col-O).

2.1.1.2. Bakterija *Agrobacterium tumefaciens*

Za unošenje retrotranspozona u stanice uročnjaka primijenjen je soj GV3101/pMP90 koji je transformiran binarnim plazmidima pTpv2i ili pTpv2.

2.1.1.3. Bakterija *Escherichia coli*

Soj XL1-Blue transformiran plazmidom pSKTpv2.

2.1.2. Plazmidi

2.1.2.1. Plazmidi pSKTpv2 i pSKTpv2i

Niti jedna kopija retrotranspozona porodice Tpv2 izolirana iz genoma graha nije bila funkcionalna (Garber i sur., 1999.). Na temelju dosadašnjih spoznaja o ulozi pojedinih regija u životnom ciklusu retrotranspozona sastavljen je potencijalno funkcionalan hibridni retrotranspozon Tpv2. Hibridni retrotranspozon Tpv2 dobiven je kombinacijom dviju nefunkcionalnih kopija retroelementa, te uklanjanjem stop-kodona i "frame-shift" mutacija. Kloniranje je obavljeno pomoću plazmida pSK⁺ (pBluescript II SK⁺, MBI Fermentas), a na kraju dobiveni plazmid, koji između dva EcoRI mjesta sadrži hibridni retrotranspozon Tpv2, nazvan je pSKTpv2 (A. Bachmair, neobjavljeno).

U svrhu olakšanog promatranja aktivnosti retrotranspozona Tpv2 u genomu uročnjaka, u plazmid pSKTpv2 ugrađen je intron iz gena GLN1 (glutamin sintetaza) biljke *Lotus japonicus*. Intron veličine 509 pb (Slika 5) ugrađen je između 2331. i 2332. pb hibridnog retrotranspozona Tpv2, u jedinstvena restrikcijska mjesta BglII i XcaI. Plazmid s intronom nazvan je pSKTpv2i (A. Bachmair, neobjavljeno).

```

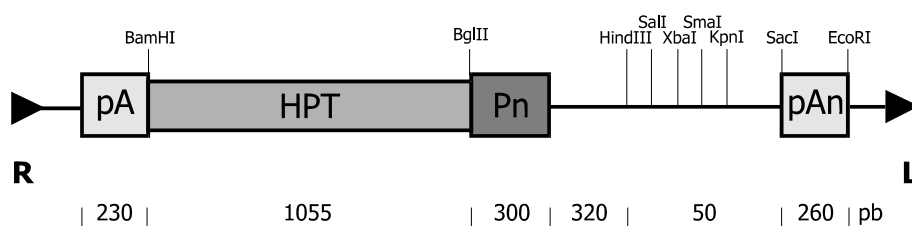
GTTAGTCTC TCTCTCAAAG ACTCGTTGTT GTTGTGTGTTG TTTTTGTTCT GTACGTACAA
GCAAACATAG CATGGATTTT ACGTGTGTTG GAACGTTTTT GTTGAATGAT TATCATGATG
ATGATGTCTT TTTGTGATTG ATTTTGTCTT TTTGATTCAT CACTCTGTTT TGTTGATATG
AGAGTCTTGA AATTCATACT ATCTCACTAT TATGAGTATA ATCACATGAG AAATCACTGA
TTTCCTCTGT TTTGACTCTG GCTTTTGGTG GTGTTTATGG TTTGATTTCA GTATTTTTTC
AACCAAAAGG CTACTTTGCT TGTTTGTATG CAATAAATTG AAAAAAGGAA GACCCTTTTT
CCCTTTTTTG TTTTTTGCTT GTTAGCTGTT TGCTTTATAT CCAATACTAC TCAATCCCAA
ATGATTTTTT TAGCTTCTTG TACCTAACTT TTTTATATCA GATTTTTCTC TCTTGATTAA
TTCTAACTTG CTTTACTTTC ACTATGGTAG

```

Slika 5. Redosljed nukleotida introna iz gena za glutamin sintetazu organizma *Lotus japonicus*. Intron je ugrađen u retrotranspozon Tpv2 između 2331. i 2332. nukleotidnog para.

2.1.2.2. Binarni vektor pBIB-HYG

Binarni vektor pBIB-HYG namijenjen je za transformaciju biljaka posredstvom bakterije *A. tumefaciens*. Sadrži početak replikacije RK2, koji omogućuje održavanje plazmida u bakterijama *A. tumefaciens* i *E. coli*. Vektor sadrži i gen za rezistenciju na kanamicin, što omogućuje probir bakterijskih transformanata, te T-DNA regiju, dio plazmida koji se prenosi iz bakterije u biljnu stanicu i ugrađuje u genom. U T-DNA se nalazi gen za higromicin fosfotransferazu (HPT), koji omogućuje rast transformiranih biljnih stanica na podlozi s higromicinom (Slika 6). U T-DNA se nalazi i višestruko restrikcijsko mjesto namijenjeno kloniranju fragmenata DNA kojima se želi transformirati biljna stanica.



Slika 6. Shematski prikaz strukture T-DNA binarnog vektora pBIB-HYG. Označene su dužine pojedinih regija u parovima baza; R-desna i L-lijeva granična sekvenca T-DNA; pA i pAn – terminatori; Pn – promotor gena za nopalinsintetazu i HPT – gen za higromicinfosfotransferazu. Označena su i jedinstvena restrikcijska mjesta. (Jelenić, 1997.)

2.1.2.3. Plazmidi pTpv2 i pTpv2i

U jedinstveno EcoRI mjesto u T-DNA plazmida pBIB-HYG ugrađeni su EcoRI fragmenti iz plazmida pSKTpv2 ili pSKTpv2i. Tako je dobiven plazmid pTpv2 koji u T-DNA sadrži retrotranspozon Tpv2 i plazmid pTpv2i koji sadrži retrotranspozon Tpv2i (A. Bachmair, neobjavljeno). Plazmidima pTpv2 i pTpv2i transformirana je bakterija *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90), a te su bakterije primijenjene za unošenje retrotranspozona u genom uročnjaka.

2.1.3. Kemikalije, enzimi i komercijalna DNA

TrisCl	Kemika	KOH	Kemika
EDTA	Kemika	Agar za kulturu biljnog tkiva	Sigma
KCH ₃ COO	Kemika	Bakterijski agar	Difco
NaOH	Kemika	Ekstrakt govedine	Difco
Ledena CH ₃ COOH	Kemika	Ekstrakt kvasca	Difco
NaCl	Kemika	Pepton	Difco
MgCl ₂ ×6H ₂ O	Kemika	Benzilaminopurin	Sigma
Kloroform	Kemika	1-naftalen-octena kiselina	Sigma
Izoamilni alkohol	Kemika	2,4-diklorofenoksi-octena kiselina	Gibco
SDS	Sigma	6(γ,γ-dimetilalilaminopurin)	Gibco
96%-tni etanol	Kemika	Indolil-maslačna kiselina	Sigma
Glukoza	Kemika	Rifampicin	Sigma
Saharoza	Kemika	Kanamicin	Sigma
Fenol pH=7,8	Sigma	Karbenicilin	Sigma
Triton X-100	Sigma	Vankomicin	Sigma
LiCl	Kemika	Higromicin	Sigma
5M HCl	Kemika	RNaza	MBI Fermentas
NH ₃ CH ₃ COO	Kemika	2-propanol	Kemika
NaCH ₃ COO	Kemika	Agarozza	Sigma
Na-citrat	Kemika	Etidium bromid	MBI Fermentas
MgCl ₂	Kemika	dNTP	La Roche
CaCl	Sigma	DIG-UTP	La Roche
CaClO	Kemika	Taq polimeraza	MBI Fermentas
MgSO ₄ ×7H ₂ O	Kemika	Pufer za Taq-polimerazu	MBI Fermentas
NBT	La Roche	β-merkptoetanol	Sigma
X-fosfat	La Roche	Klenow enzim	MBI Fermentas
Ficoll 400	Sigma	DNA λ-faga	MBI Fermentas
Boja Orange G	Serva	BamHI	MBI Fermentas
Mio-inozitol	Sigma	EcoRI	MBI Fermentas
MS-mikro i makroelementi	Sigma	HindIII	MBI Fermentas
Vitamin B1	Gibco	Pufer za BamHI	MBI Fermentas
Vitamin B6	Gibco	Pufer za EcoRI	MBI Fermentas
Nikotinska kiselina	Gibco	Pufer za HindIII	MBI Fermentas
Glicin	Sigma		

2.1.4. Otopine

Nakon priprema sve sam otopine sterilizirala autoklaviranjem na 122°C, 20 minuta.

2.1.4.1. Izolacija plazmidne DNA

- 1M TrisCl, 200 ml: 24,228 g Tris (hidroksimetil) aminometana otopila sam u 150 ml dH₂O, titrirala s 5M HCl-om do pH=8 i dopunila s dH₂O do 200 ml.
- 0,5M EDTA, 500 ml: 29,225 g EDTA otopila sam u oko 350 ml dH₂O te postupno dodala 2 g NaOH u zrcima. Otopinu sam titrirala s 1M NaOH do pH=8 i dopunila s dH₂O do 500 ml.
- KCH₃COO pH=4,8, 100 ml: 29,44 g kalijevog acetata otopila sam u oko 80 ml dH₂O i dodala 11,5 ml ledene octene kiseline. Otopinu sam dopunila s dH₂O do 500 ml i izmjerila pH, koji je bio 4,8.
- GTE pufer, 200 ml: Otopila sam 1,98 g glukoze u malo dH₂O, dodala 5 ml 1M otopine TrisCl pH=8 i 4 ml 0,5M otopine EDTA, te dopunila s dH₂O do 200 ml.
- 0,22M NaOH, 50 ml: 0,44 g natrijevog hidroksida otopila sam u 50 ml dH₂O.
- Kloroform-izoamilni alkohol 24:1, 100 ml: U 96 ml kloroforma dodala sam 4 ml izoamilnog alkohola i otopinu čuvala u tamnoj boci.
- 10%-tni SDS, 100 ml: 10 g natrij-dodecil sulfata otopila sam u 100 ml dH₂O.
- 70%-tni C₂H₅OH, 100 ml: 72,9 ml 96%-tnog etanola nadopunila sam s dH₂O do 100 ml.

2.1.4.2. Izolacija biljne genomske DNA

Navedene su samo one otopine koje nisu opisane u točki 2.1.4.1.

- Ekstrakcijski pufer, 100 ml: 10 ml 1M TrisCl pH=8, 10 ml 0,5M EDTA pH=8 i 0,3 g NaCl otopila sam u manjem volumenu dH₂O. Dodala sam 50 µl β-merkaptotetanola i dopunila s dH₂O do 100 ml.
- Pufer TE, 100 ml: Pomiješala sam 1 ml 1M TrisCl pH=8 i 0,2 ml 0,5M EDTA pH=8, te nadopunila s dH₂O do 100 ml.

- Fenol-kloroform-izoamilni alkohol 25:24:1: Puferirani fenol pH=7,8 pomiješala sam u jednakom volumnom omjeru s prethodno priređenom otopinom kloroform:izoamilni alkohol (24:1), direktno u uzorku.
- 3M NaCH₃COO, 100 ml: 24,61 g natrijevog acetata otopila sam u 100 ml dH₂O.

2.1.4.3. DNA digestija i izolacija s gela

Navedene su samo one otopine koje nisu opisane u točkama 2.1.4.1. i 2.1.4.2.

- Pufer za elektroforezu 50× TAE, 250 ml: 60,5 g TrisCl otopila sam u malo dH₂O, dodala 14,27 ml ledene octene kiseline i 25 ml 0,5M EDTA pH=8, te nadopunila s dH₂O do 250 ml.
- Boja Orange G, 10 ml: 1,5 g Ficoll 400 i boje Orange G na vrhu spatule (nije potrebno vagati) pomiješala sam s malo dH₂O u graduiranoj pipeti. Nakon što su se kemikalije otopile, dopunila sam s dH₂O do 10 ml. Boju sam čuvala na +4°C.
- 3M KCH₃COO, 100 ml: 29,44 g kalijevog acetata otopila sam u 100 ml dH₂O.

2.1.4.4. Isključivanje sjemenki uročnjaka

Navedene su samo one otopine koje nisu opisane u točkama 2.1.4.1., 2.1.4.2. i 2.1.4.3.

- Otopina za sterilizaciju sjemenki, 50 ml: 5 g CaClO i 0,25 g Triton X-100 otopila sam u 50 ml dH₂O.

2.1.4.5. Hibridizacija po Southernu

Navedene su samo one otopine koje nisu opisane u točkama 2.1.4.1., 2.1.4.2., 2.1.4.3. i 2.1.4.4.

- 5M LiCl, 50 ml: 10,6 g litijevog klorida otopila sam u 50 ml dH₂O.
- 0,25M HCl, 1000 ml: 23 ml koncentrirane otopine kloridne kiseline nadopunila sam s dH₂O do 1000 ml.
- 0,5M NaOH, 1000 ml: 20 g natrijevog hidroksida otopila sam u 1000 ml dH₂O.
- 1M NH₃CH₃COO 1000 ml: 77,1 g amonijevog acetata otopila sam u 1000 ml dH₂O.
- 0,4M NaOH, 1000 ml: 16 g natrijevog hidroksida otopila sam u 1000 ml dH₂O.

- SSC 20×, 250 ml: 43,83 g natrijevog klorida i 22,06 g natrijevog citrata $\times 2H_2O$ otopila sam u 250 ml dH_2O .

- Otopina za prehibridizaciju:

SSC 20×	25%
“Blocking reagent” za sprečavanje nespecifičnih reakcija	1,0%
Natrij N-laurilsarkozin	0,1%
SDS	0,02%
Denaturirana nehomologna DNA-DNA nosač	100 μ g/ml

- Otopina za hibridizaciju: Ista kao za prehibridizaciju, uz dodatak DNA probe u koncentraciji 20-50 ng/ml.
- Otopina A, 100 ml: 10 ml SSC 20 \times i 1 ml 10% SDS razrijedila sam s 89 ml dH_2O .
- Otopina B, 100 ml: 0,5 ml SSC 20 \times i 1 ml 10% SDS razrijedila sam s 98,5 ml dH_2O .
- Pufer za ispiranje: Dodala sam Tris-HCl (pH=7,5) do koncentracije 0,1M i NaCl do koncentracije 0,15M.
- Pufer za sprečavanje nespecifičnih reakcija: 1 g smjese za sprečavanje nespecifičnih reakcija razrijedila sam, uz zagrijavanje, do koncentracije od 1%, u 100 ml pufera za ispiranje.
- Pufer za imunološku reakciju: Razrijedila sam kompleks antitijela i alkalne fosfataze (“AP-conjugate”) u puferu za sprečavanje nespecifičnih reakcija u omjeru 1:5000.
- Pufer za obojenu reakciju, 500 ml: 50 ml 1M Tris (pH=9,7), 10 ml 5M NaCl i 25 ml 1M $MgCl_2$ dodala sam u 415 ml dH_2O te pomoću HCl podesila pH otopine na 9,5.
- Otopina za postizanje obojene reakcije: Na 10 ml pufera za obojenu reakciju dodala sam 45 μ l nitrozo-plavi-tetrazolij (NBT) i 35 μ l 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat (X-fosfat).

2.1.5. Hranjive podloge

Sve podloge sam sterilizirala autoklaviranjem na 122°C, 18 minuta.

- **Bakterijska podloga 2 TY, 500 ml, uz dodatak ampicilina:**

Pomiješala sam 5 g peptona, 5 g ekstrakta kvasca i 2,5 g NaCl i otopila u manjem volumenu dH₂O. Za krutu podlogu dodala sam još 7,5 g bakterijskog agara. Nakon što su se sastojci otopili nadopunila sam otopinu s dH₂O do 500 ml i dodala magnetič za miješanje. Nakon autoklaviranja i hlađenja podloge do oko 50°C na magnetskoj miješalici, u sterilnim uvjetima dodala sam u podlogu ampicilin do konačne koncentracije 100 mg/ml. Podlogu sam potom razlila u Petrijeve zdjelice i čuvala na +4°C.

- **Tekuća bakterijska podloga YEB, 500 ml, uz dodatak rifampicina i kanamicina:**

Pomiješala sam 2,5 g goveđeg ekstrakta, 0,5 g ekstrakta kvasca, 0,5 g peptona i 2,5 g saharoze. Navedene sastojke otopila sam u manjem volumenu dH₂O i, nakon što su se sastojci otopili, dopunila s dH₂O do 500 ml. Podlogu sam ulila u bocu za autoklaviranje uz dodatak magnetiča za miješanje. Nakon autoklaviranja, podlogu sam ohladila na magnetskoj miješalici do oko 50°C i u sterilnim uvjetima dodala antibiotike rifampicin do koncentracije 100 mg/l, te kanamicin do koncentracije 50 mg/l.

- **Murashige&Skoog (MS) hranjiva podloga, 1000 ml:**

Pomiješala sam 30 g saharoze i 100 mg inozitola i otopila u oko 500 ml dH₂O. U otopinu sam dodala 1×MS makro i mikroelemente, 0,1 mg vitamina B1, 0,5 mg B6, 0,5 mg nikotinske kiseline i 2 mg glicina. PH otopine podesila sam na 5,9 dodavanjem 1M KOH, dopunila dH₂O do 1000 ml i ulila u staklene boce za autoklaviranje. Kod pripravljanja krutog medija, prije autoklaviranja dodala sam 8,5 g agara za kulturu biljnog tkiva i magnetič za miješanje. Po autoklaviranju podlogu sam ravnomjerno hladila pomoću magnetske mješalice do temperature oko 50°C i potom ju ulila u sterilne Erlenmeyerove tikvice ili na Petrijeve ploče, po potrebi. Nakon što se podloga stvrdnula, tikvice i ploče sam čuvala na +4°C.

- **Podloga Ara 1/1 za kokultivaciju bakterija i biljnog tkiva, 1000 ml:**

Podloga je identična podlozi MS, osim što sam nakon autoklaviranja dodala biljne regulatore rasta benzilaminopurin (BAP) u koncentraciji 1 mg/l i 1-naftalen-octenu kiselinu (NAA) u koncentraciji 0,1 mg/l. svrha ove podloge je poticanje regeneracije izdanaka.

- **Podloga 2,4-D za poticanje staničnih dioba, 1000 ml:**

Podloga je identična podlozi Ara 1/1, uz dodatak 2,4-diklorofenoksi-octene kiseline (2,4-D) u koncentraciji od 0,5 mg/l.

- **Podloga za regeneraciju transgenih izdanaka, 1000 ml:**

Podloga je identična podlozi Ara 1/1, uz dodatak antibiotika karbenicilina do koncentracije 500 mg/l, vankomicina do koncentracije 500 mg/l i higromicina do koncentracije 20 mg/l. Karbenicilin i vankomicin sprečavaju rast bakterija, a higromicin je korišten za selekciju transformiranih biljnih stanica.

- **Podloga 2iP za izduživanje regeneriranih izdanaka, 1000 ml:**

Podloga je identična podlozi MS, uz dodatak biljnih regulatora rasta 6(γ , γ -dimetilalilaminopurin) (2iP) do koncentracije od 5 mg/l i 1-naftalen-octene kiseline (NAA) do koncentracije od 0,1 mg/l, te antibiotika karbenicilina do koncentracije 1 g/l i higromicina do koncentracije 20 mg/l.

2.2. METODE

2.2.1. Sterilizacija i isključavanje sjemenki uročnjaka *A. thaliana*, te priprema korjenčića za transformaciju

Sjemenke uročnjaka *A. thaliana* ekotipova Wassilevskia i Columbia sterilizirala sam u sterilizacijskoj otopini 15 minuta, uz miješanje na vorteksu. Po sterilizaciji sjemenke sam ispirala 5 puta u oko 1 ml sterilne dH₂O i nasadila po oko 10 sjemenki u svaku Erlenmeyerovu tikvicu, u 250 ml tekuće podloge MS. Tikvice sam držala dva i pol tjedna u klima komori na temperaturi 25°C, duljini dana od 12h, na miješalici 150rpm.

Nakon dva tjedna izvadila sam klijance u sterilnim uvjetima, izdvojila korjenčiće i lagano ih izgrebla skalpelom. Tako pripremljene korjenčiće nasadila sam u Petrijeve zdjelice na podlogu 2,4-D, za indukciju kalusa. Na toj podlozi korjenčiće sam uzgajala 3 dana, do transformacije.

2.2.2. Transformacija korjenčića uročnjaka *A. thaliana* bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* i kultivacija transformiranog tkiva

Agrobakterije sojeva koji sadrže plazmide pTpv2i i pTpv2 nasadila sam u 3 ml tekuće podloge YEB, uz dodatak rifampicina i kanamicina i ostavila preko noći na 30°C, na tresilici pri 200rpm. Idući dan prebacila sam 1 ml prekonoćne bakterijske kulture u 300 ml podloge istog sastava i inkubirala pri istim uvjetima. Nakon dva dana centrifugirala sam bakterijske kulture agrobakterija u centrifugi Sorvall RC-5B, rotoru GSA, 10 minuta pri 7000rpm i resuspendirala talog u 80 ml tekuće podloge MS. U dvije sterilne Petrijeve zdjelice ulila sam po 40 ml bakterija s plazmidom pTpv2i, a u dvije po 40 ml bakterija s pTpv2. S krutih podloga 2,4-D prebacila sam korjenčiće uročnjaka u bakterijske suspenzije i to tako da svaki ekotip (*Wassilevskia* i *Columbia*) dođe u kontakt sa oba soja agrobakterija. Kokultivaciju sam provodila 30 minuta. Nakon tog vremena korjenčiće sam osušila na filter-papiru i nasadila ih na krutu Ara 1/1 podlogu. Nakon transformacije korjenčići su uzgajani u klima komori, pri 25°C i 12-satnom dnevnom režimu. Nakon tri dana agrobakterije su prerasle korjenčiće, koje sam isprala u sterilnim uvjetima u tekućoj podlozi MS, uz dodatak 1 mg/l vankomicina i nasadila na krutu podlogu za poticanje regeneracije transformiranih izdanaka. Vankomicin i karbenicilin u podlozi sprečavaju rast bakterijskih stanica, a higromicin netransformiranih biljnih stanica.

2.2.3. Regeneracija, mikrorazmnožavanje i zakorjenjivanje transgenih izdanaka

Tjedan dana nakon transformacije korjenčića, počeli su se razvijati kalusi na mjestima prodora bakterija u tkivo korjenčića. Veće kalusne nakupine odvojila sam od ostatka korjenčića i uzgajala na podlozi istog sastava tijekom mjesec dana. Tada su se razvili prvi izdanci koje sam prebacila na podlogu 2iP, za izduživanje izdanaka. Prvo su regenerirale biljke ekotipa *Wassilevskia*, a dva tjedna kasnije i *Columbia*. Svaki

regenerirani izdanak uzgajala sam kao zasebnu liniju. Izdanke sam umnažala kultivacijom nodalnih segmenata tijekom nekoliko mjeseci, presađujući ih svaka dva tjedna. Između presađivanja materijal je rastao u klima komori pri temperaturi od 25°C i duljini dana od 12h. Tijekom tog vremena sakupljala sam dio biljnog tkiva, vagala ga i pohranjivala ga na -20°C. Kada sam dobila dovoljno biomase svake linije (oko 4 g), slijedila je izolacija genomske DNA iz transgenih biljaka. Dio izdanaka uranjala sam bazom u 2,5µM indolil-maslačnoj kiselini (IBA), u trajanju od 10 minuta i nasadivala na krutu MS podlogu za zakorjenjivanje. Nakon što su eksplantati razvili korjenje, presadila sam ih u autoklaviranu zemlju, u svrhu dobivanja sjemenja.

2.2.4. Izolacija genomske DNA iz transgenih linija uročnjaka

DNA uročnjaka izolirala sam iz transgenih linija ekotipova Wassilevskia i Columbia, u svrhu provjere aktivnosti retrotranspozona Tpv2 lančanom reakcijom polimerazom (PCR) i hibridizacijom po Southernu. Genomsku DNA izolirala sam iz uzoraka kalusnog tkiva i cijelih biljaka, prethodno izvaganih (oko 4 g) i pohranjenih na -20°C. Tkivo sam homogenizirala u tarioniku, hladeći ga dodavanjem tekućeg dušika tijekom homogenizacije. Praškasti homogenat prebacila sam u sterilnu kivetu za centrifugiranje volumena 30 ml, u koju sam prethodno dodala 15 ml ekstrakcijskog pufera zagrijanog na 65°C i 3 ml 10% SDS. Lagano sam sve promiješala i inkubirala u vodenoj kupelji na 65°C, 15 minuta. Zatim sam dodala 7 ml 3M KCH₃COO, pažljivo, ali dobro promiješala i ostavila na ledu 20 minuta. Otopinu sam centrifugirala 15 minuta, u centrifugi Beckmann, rotoru JA-20, na 18000rpm i +4°C. Supernatant sam prebacila u novu sterilnu kivetu kroz filter "Miracloth", dodala 10 ml 2-propanola, promiješala i stavila na -20°C preko noći. Idući dan kivete sam centrifugirala u istoj centrifugi, na 18000rpm i +4°C, 15 minuta. Dobiveni supernatant sam bacila, a talogu dodala 2 ml 70%-tnog etanola i ponovo centrifugirala, pod istim uvjetima. Nakon centrifugiranja, bacila sam etanol, osušila talog i dodala 1 ml TE pufera. Kivete sam stavila na 70°C, oko 3 sata, dok se talog nije potpuno otopio. Tijekom otapanja dodala sam 2µl otopine RNaze (10 µg/µl). Potom sam uzorak razdijelila u Eppendorf epruvete od 2ml i dodala 1/30 volumena (33 µl) 3M KCH₃COO i 96%-tnog etanola do konačne koncentracije od 10% (100 µl), te sve ostavila na ledu 15 minuta. Nakon tog vremena uzorke sam centrifugirala 15 minuta pri 10000rpm na +4°C. Dobiveni supernatant prebacila sam u novu sterilnu Eppendorf

epruvetu, dodala 250 μ l fenola pH=7,8 i 250 μ l smjese kloroform:izoamilni alkohol (24:1), promiješala i centrifugirala u centrifugi Eppendorf 5415C, 5 minuta na sobnoj temperaturi, pri 10000rpm. Supernatant sam pažljivo prebacila u novu sterilnu Eppendorf epruvetu. Dodala sam 10% 3M NaCH₃COO i volumen izopropanola jednak volumenu uzorka s dodanim NaCH₃COO, te ostavila 1h na -20°C. Nakon toga uzorak sam centrifugirala na sobnoj temperaturi 15 minuta pri 14000rpm. Supernatant sam bacila, a talog isprala sa 70%-tnim etanolom i ponovo sve centrifugirala na sobnoj temperaturi, 14000rpm, 5 minuta. Kad se talog osušio otopila sam ga u 100 μ l sterilne dH₂O na 55°C. Uzorak sam stavila na čuvanje na +4°C.

2.2.5. Izolacija plazmidne DNA

Ovim postupkom izolirala sam plazmid pSKTpv2 iz bakterije *E.coli* XL1-Blue. Plazmid sam nakon izolacije pocijepala s restrikcijским enzimom BamHI i dobiveni linearni oblik sam iskoristila kao probu za hibridizaciju po Southernu. U prvom koraku sam nasadila jednu koloniju bakterije *E. coli* XL1-Blue s odgovarajućim plazmidom na 3 ml tekuće podloge 2 TY s ampicilinom. Bakterije sam uzgajala preko noći na tresilici pri 200rpm i 37°C. Prekonoćnu kulturu ulila sam u Eppendorf epruvete i centrifugirala 5 minuta u centrifugi Eppendorf 5415C pri 6000rpm, na sobnoj temperaturi. Odlila sam supernatant i bakterijski talog resuspendirala u 100 μ l pufera GTE i ostavila ga 5 minuta na sobnoj temperaturi. Potom sam dodala 200 μ l svježe pripremljene otopine lužnatog SDS-a (pomiješala sam 0,22M NaOH i 10% SDS u jednakim omjerima), promiješala i držala na ledu 5 minuta. U to sam dodala 250 μ l otopine KCH₃COO pH=4,8, dobro ručno promiješala i stavila na led 15 minuta. Slijedilo je centrifugiranje u centrifugi Eppendorf, pri 14000rpm, na 4°C, 10 minuta. Supernatant sam prebacila u novu Eppendorf epruvetu i dodala 250 μ l fenola pH=7,8 i 250 μ l smjese kloroform:izoamilni alkohol (24:1). Smjesu sam dobro izmiješala i centrifugirala 5 minuta u centrifugi Eppendorf 5415C pri 14000rpm i sobnoj temperaturi. Gornju fazu sam vrlo pažljivo prebacila u sterilnu epruvetu, dodala isti volumen 2-propanola, lagano ali dobro promiješala i ostavila na -20°C, barem 15 minuta. Nakon 15-minutnog centrifugiranja na sobnoj temperaturi u centrifugi Eppendorf 5415C pri 14000rpm, pažljivo sam izbacila supernatant i talog isprala u 1 ml 70%-tnog etanola. Uzorak sam ponovo centrifugirala pri istim uvjetima, 5 minuta, izbacila supernatant i osušila talog. Osušeni talog sam otopila u 10 μ l

sterilne ddH₂O i dodala 1 μl otopine RNaze (10 μg/μl). Uzorak sam ostavila 20 minuta na 37°C, a zatim ga pohranila na -20°C.

2.2.6. Restriksijska digestija DNA

Radila sam dvije zasebne digestije: digestiju plazmida pSKTpv2 i genomske DNA uročnjaka. Restriksijsku digestiju plazmida pSKTpv2 enzimom BamHI radila sam u svrhu dobivanja linearnog oblika koji je korišten kao hibridizacijska proba za analizu hibridizacijom po Southernu. Digestiju genomske DNA uročnjaka enzimom EcoRI radila sam kao pripremu DNA za daljnju elektroforezu, prenašanje na hibridizacijsku membranu, te analizu hibridizacijom po Southernu. Digestiju sam, u oba slučaja, provodila preko noći, u inkubatoru na 37°C, prema protokolu:

100 μl uzorka DNA
11,1 μl pufera za restriksijsku endonukleazu
5 μl (10 u/μl) restriksijske endonukleaze

Zbog potreba analize hibridizacijom po Southernu, prije elektroforeze i prijenosa pocijepane genomske DNA na hibridizacijsku membranu, potrebno je što više ukoncentrirati uzorak. To sam učinila precipitacijom tako da sam uzorak tretiran restriksijskim enzimom razrijedila na 400 μl, dodala 3M KCH₃COO do volumena od 10% (44 μl), te dodala dvostruko veću količinu 96%-tnog etanola (890 μl). Smjesu sam ostavila 1h na -20°C, nakon čega sam ju centrifugirala 15 minuta, pri 14000rpm. Dobiveni supernatant sam odlila, a DNA u talogu resuspendirala u 15 μl dH₂O, te nakon otapanja čuvala na -20°C.

2.2.7. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu

Elektroforezu na agaroznom gelu koristila sam pri provjeri digestije plazmida pSKTpv2, pročišćavanju plazmida pSKTpv2 pocijepanog s BamHI enzimom, u sklopu hibridizacije po Southernu, te za provjeru produkata nastalih lančanom reakcijom polimerazom.

Za provjeru digestije plazmidne DNA i pročišćavanje plazmida pSKTpv2 lineariziranog pomoću enzima BamHI koristila sam 1%-tni agarozni gel, koji sam pripravila odvagavši 0,5 g agaroze u 50 ml TAE pufera. Za elektroforezu digerirane genomske DNA koristila sam 0,8%-tni gel volumena 80 ml. Otopinu sam zagrijala u komercijalnoj mikrovalnoj pećnici do vrenja. Nakon što se agarozna otopila i ohladila na oko 50°C, dodala sam 5 µl etidij-bromida (10 µg/µl), te sam gel izlila u kadicu i pričekala oko 30 minuta da se stvrdne. Kada se gel stvrdnuo, izvadila sam češljic za stvaranje jažica i kadicu s gelom stavila u uređaj za elektroforezu. Elektroforezu sam provodila pri naponu od 40V, dok boja Orange G nije prošla oko 2/3 dužine gela.

Za provjeru produkata nastalih lančanom reakcijom polimerazom koristila sam 1,2 %-tni gel, koji sam pripravila na prethodno opisan način, s razlikom što sam u isti volumen pufera odvagavši 0,6 g agaroze.

2.2.8. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Nakon digestije plazmida pSKTpv2 restriksijskim enzimom BamHI i elektroforeze na agaroznom gelu, iz gela sam izolirala linearni fragment. Nakon elektroforeze, na UV-transiluminatoru vizualizirala sam i izrezala traženi fragment. Izolaciju sam provodila pomoću kompleta "Schleider&Schuell Elu-Quick". U Eppendorf epruveti sam izoliranom fragmentu volumena oko 100 µl dodala tri puta više (300 µl) "binding buffer"-a i držala na 56°C uz trešnju, dok se agarozna nije otopila. Nakon toga, dodala sam 20 µl "glass concentrate"-a (staklenih kuglica), promiješanih pomoću vorteksa, i ostavila 15 minuta na ledu. Kako se kuglice talože, svakih 5 minuta sam ih lagano promiješala. Staklene kuglice sam istaložila centrifugiranjem pri 14000rpm, nekoliko sekundi. Supernatant sam bacila, a talog isprala s 400 µl "wash buffer"-a (ohlađenog na -20°C). Nakon kratkotrajnog centrifugiranja pri 14000rpm, bacila sam supernatant i kuglice resuspendirala u 400 µl "salt reduction buffer"-a. Kratkotrajnim centrifugiranjem pri 14000rpm ponovno sam istaložila staklene kuglice, bacila supernatant i ostavila talog da se osuši na 55°C. Osušeni talog resuspendirala sam u 20µl dH₂O i ostavila na 56°C, 15 minuta, uz povremeno miješanje, pri čemu DNA prelazi sa staklenih čestica u vodenu fazu. Centrifugiranjem 10 minuta pri 14000rpm odvojila sam vodenu fazu s DNA od taloga staklenih kuglica i prebacila je u sterilnu Eppendorf epruvetu, na -20°C.

2.2.9. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančanu reakciju polimerazom koristila sam za provjeru aktivnosti retrotranspozona Tpv2 u transformiranim linijama uročnjaka. Reakciju sam provodila u epruветama volumena 250 μl na PCR uređaju “Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400”. Reakcijsku smjesu pripravila sam prema protokolu:

dH ₂ O	35 μl
MgCl ₂ (25 mM)	4 μl
dNTP (2 mM)	3 μl
Taq pufer	5 μl
početnice	1+1 μl
genomska DNA	1 μl
ukupni volumen	50 μl
polimeraza Taq	1-2 μl

Reakciju sam provodila u 35 ciklusa prema protokolu:

94°C – 30 s	početna denaturacija
94°C – 30 s	denaturacija
55°C – 30 s	vezanje početnica
72°C – 90 s	sinteza DNA
72°C – 7 min.	završna sinteza

Korištene početnice su sekvence koje omeđuju intron retrotranspozona Tpv2i: P2084-2103 (5'-CCGAGGCATTTGAGGTGTTC-3') i P2242-2223 (5'-AAGGCGATTTCTAACTGCAC-3').

2.2.10. Neradioaktivna hibridizacija po Southernu

Neradioaktivnu hibridizaciju koristila sam kao glavnu metodu utvrđivanja aktivnosti retrotranspozona Tpv2 u stanicama uročnjaka.

Priprema probe za hibridizaciju

Probu za hibridizaciju pripremila sam pomoću kompleta kemikalija za neradioaktivnu hibridizaciju proizvođača Boeringer, prema uputama. Kao probu koristila sam linearizirani plazmid pSKTpv2, koji sam ranije izolirala iz gela. Fragment sam denaturirala 5 minuta na 95°C, u svrhu dobivanja jednolančanog oblika probe. Zatim sam pripravila smjesu za obilježavanje:

1 µl DNA fragmenta (1 µg/µl)
1 µl λ/HindIII (10 ng/µl)
11 µl sterilne dH ₂ O
3 µl smjese heksanukleotida
3 µl dNTP (DIG je uključen)
1 µl Klenow-og fragmenta

Reakcija je tekla preko noći, ne više od 20h. Reakciju sam zaustavila dodavanjem 1 µl 0,5M EDTA pH=8. Obilježenu DNA sam istaložila s 2 µl 5M LiCl i 75 µl 96%-tnog etanola i precipitacijom na -20°C, 2h. DNA sam istaložila centrifugiranjem 15 minuta, pri 14000rpm. Talog sam potom osušila i otopila u 50 µl TE pufera.

Prijenos biljne DNA na membranu

Na 80-mililitarski 0,8%-tni gel nanijela sam DNA faga λ pocijepanu restrikcijским enzimom HindIII kao biljeg, plazmid pSKTpv2 pocijepan restrikcijским enzimom EcoRI kao kontrolu, te uzorke genomske DNA pocijepane restrikcijским enzimom EcoRI. Nakon završetka elektroforeze gel sam tretirala s 0,25M HCl, oko 10 minuta, dok brom-fenol plava migracijska boja nije požutjela, u svrhu depurinacije. Zatim sam isprala gel u dH₂O i tretirala ga s 0,5M NaOH i 1M NH₄CH₃COO, do ponovnog uspostavljanja plave boje. Gel sam postavila na pripremljenu najlonsku membranu, djelomično prekrivenu maskom, u uređaj za vakuum-prijenos DNA. Prijenos DNA s gela na membranu provodila sam oko 50 minuta u 0,4M NaOH, pri podtlaku od 15kPa. Nakon prijenosa membranu sam ispirala u 1M NH₄CH₃COO oko 15 minuta, osušila je na zraku i zatim grijala oko 30 minuta na 120°C, u svrhu fiksacije.

Prehibridizacija i hibridizacija

Prehibridizaciju membrane provodila sam u zataljenoj plastičnoj vrećici sa 100 ml otopine za hibridizaciju na temperaturi od 68°C, tijekom dvosatnog miješanja u vodenoj kupelji. Potom sam izbacila prehibridizacijsku otopinu iz vrećice i dodala 10 ml hibridizacijske otopine. Hibridizacija je provedena preko noći, na 68°C, uz protresanje. Nakon hibridizacije membranu sam ispirala 2 puta po 5 minuta u 50 ml otopine A, pri sobnoj temperaturi, i zatim 2 puta po 30 minuta u 100 ml otopine B, pri 68°C.

Imunološka detekcija

Nakon posthibridizacijskog ispiranja membranu sam isprala u 100 ml pufera za ispiranje, zatim 30 minuta u 100 ml pufera za sprečavanje nespecifičnih reakcija i 30 minuta u 20 ml pufera za imunološku reakciju. Ispiranjem 2×15 minuta sa po 100 ml pufera za ispiranje odstranila sam komplekse antitijela i alkalne fosfataze koji se nisu vezali za digoksin. Slijedila je inkubacija u puferu za obojenu reakciju, u trajanju 2 minute, a potom sam membranu zatalila u vrećicu s 10 ml otopine za obojenu reakciju i inkubirala ju pri 37°C, u tami, dok se nisu pojavile linije uočljivog intenziteta. Reakciju sam zaustavila ispiranjem u 50 ml pufera za zaustavljanje obojene reakcije.

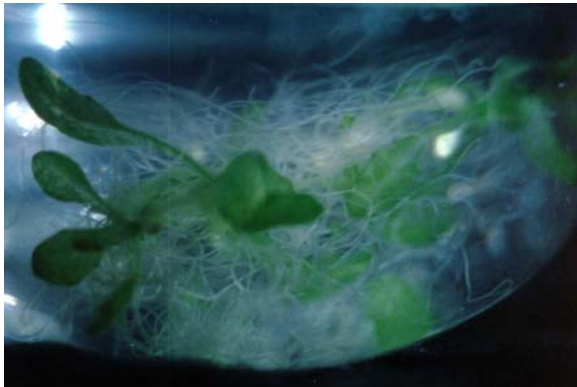
Sve navedene inkubacije i ispiranja (osim razvijanja boje u tami) izvodila sam na sobnoj temperaturi, uz protresanje.

3. REZULTATI

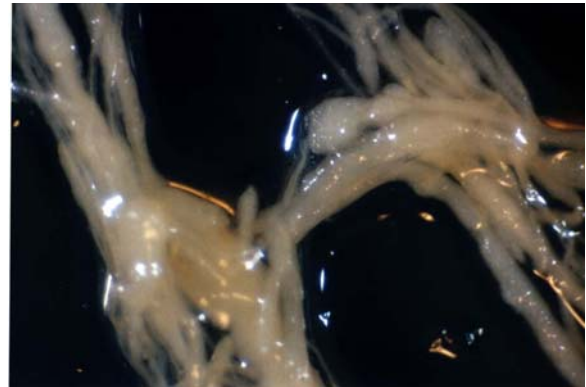
3.1. TRANSFORMACIJA UROČNJAKA I REGENERACIJA TRANSGENIH BILJAKA

Cilj ovog rada bio je istraživanje aktivnosti hibridnog retrotranspozona graha Tpv2 u stanicama uročnjaka. Retrotranspozoni Tpv2, kao i oblik s intronom, Tpv2i, ugrađeni su u genom stanica korijena uročnjaka posredstvom bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Korjenje je dobiveno isključivanjem sterilnih sjemenki uročnjaka ekotipova Wassilevskia (WS) i Columbia (Col) u tekućoj podlozi MS (Slika 7a). Korjenčići su izdvojeni od ostatka biljke i presađeni na podlogu 2,4-D za poticanje staničnih diobi. Nakon toga korjenčići su kokultivirani s bakterijama *A. tumefaciens* koje su sadržavale binarne plazmide Tpv2 ili Tpv2i. Transformacijom su dobivena četiri tipa transgenih linija uročnjaka: WS+ (ekotip Wassilevskia transformiran retrotranspozonom Tpv2i), WS- (ekotip Wassilevskia transformiran retrotranspozonom Tpv2), Col+ (ekotip Columbia transformiran retrotranspozonom Tpv2i) i Col- (ekotip Columbia transformiran retrotranspozonom Tpv2).

Nakon transformacije korjenčići su uzgajani na krutoj podlozi Ara1/1 s karbenicilinom, vankomicinom i higromicinom (Slika 7b). Karbenicilin i vankomicin onemogućuju rast bakterija, a higromicin netransformiranog biljnog tkiva. Nakon tjedan dana pojavili su se dobro vidljivi kalusi (Slika 7c). Kalusi promjera 2 mm kultivirani su zasebno na podlozi istog sastava (Slika 7d). Izdanci su se razvili pet tjedana nakon transformacije kod linija ekotipa Wassilevskia, a dva tjedna kasnije kod ekotipa Columbia (Slike 7e,f). Izdanci su presađeni na podlogu 2iP za izduživanje, a umnažani su mikropropagacijom nodalnih odsječaka (Slika 7g), radi dobivanja dovoljno biomase za izolaciju genomske DNA, te za zakorjenjivanje. Nakon uranjanja baze izdanaka u IBA-u, izdanci su uspješno zakorijenjeni na podlozi MS s 20 mg/l higromicina i kasnije presađeni u zemlju (Slike 7h,i). Biljke WS+ izgubljene su tijekom kultiviranja zbog kontaminacije podloge.



a)



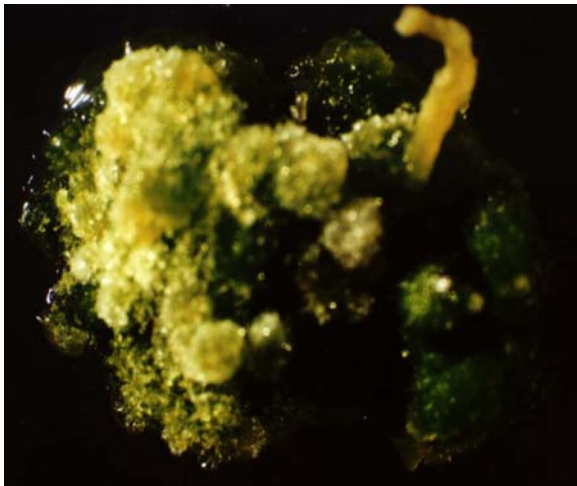
b)



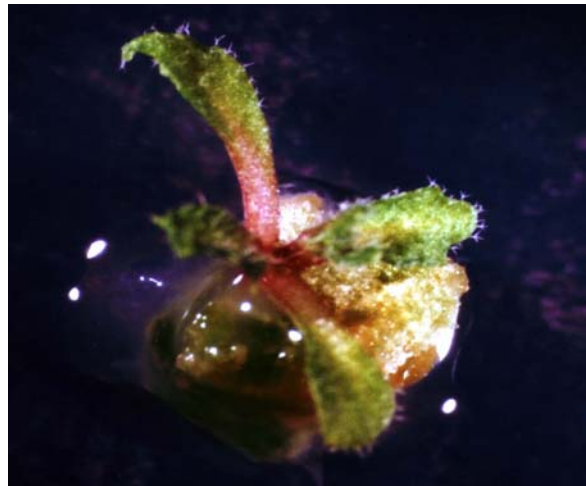
c)



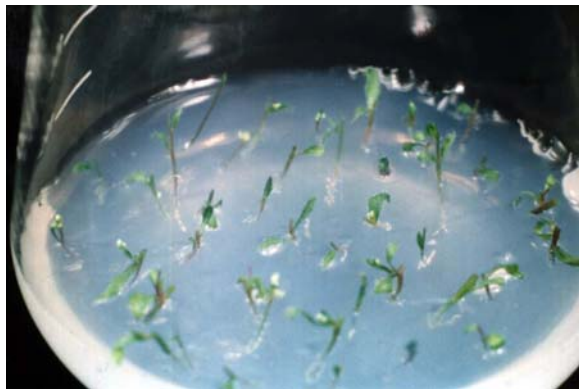
d)



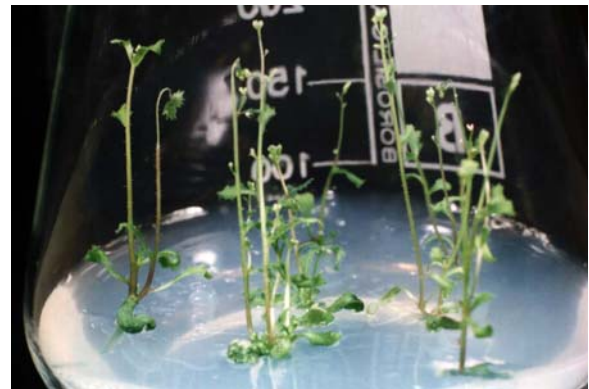
e)



f)



g)



h)



i)

Slika 7. Kultura tkiva uročnjaka *Arabidopsis thaliana*. a) Isključivanje sjemenki u tekućem mediju MS. b) Korjenčići nakon transformacije bakterijom *A. tumefaciens* na podlozi Ara 1/1. c) Početak stvaranja kalusnog tkiva na mjestima transformacije. d) Kalusi su odvojeni od korjenčića i uzgajani na istom mediju do pojave izdanaka. e,f) Razvoj izdanaka iz transgenog kalusnog tkiva uročnjaka. g,h) Izdanci su uzgajani na podlozi 2iP za izduživanje izdanaka. i) Razvijene biljčice su zakorijenjene i prebačene u zemlju.

3.2. ANALIZA AKTIVNOSTI RETROTRANSPOZONA Tpv2i LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM

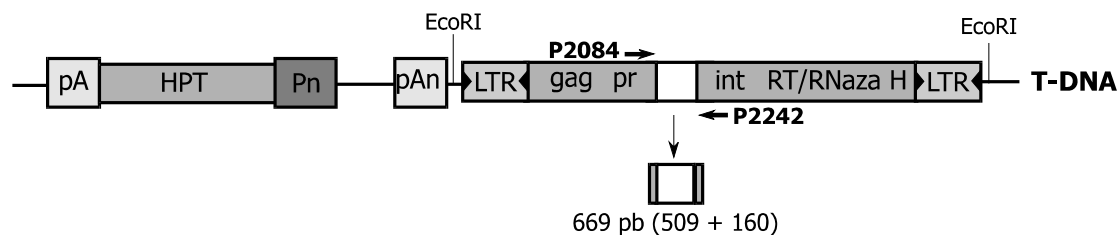
Retrotranspozon Tpv2i sadrži intron dužine 509 pb, ugrađen između nukleotida 2331 i 2332. Prisustvo introna u strukturi retrotranspozona omogućuje praćenje aktivnosti PCR-om, jer se intron izrezuje iz molekule RNA koja služi kao kalup tijekom reverzne transkripcije, te stoga nove DNA-kopije retrotranspozona ne sadrže intron.

Pet mjeseci nakon transformacije izolirana je DNA iz biljčica osam transgenih linija ekotipa Columbia, od kojih je pet transformirano retrotranspozonom Tpv2i (Col+1, Col+2, Col+3, Col+5, Col+6), a tri retrotranspozonom Tpv2 (Col-1, Col-2, Col-4). PCR-om je umnožen dio omeđen početnicama P2084 i P2242, oko introna retrotranspozona Tpv2. U slučaju aktivnosti retrotranspozona u linijama Tpv2i, intron će se izrezati i novonastale kopije će kao produkt PCR-a dati fragment od 160 pb, što odgovara dijelu retrotranspozona između korištenih početnica (Slika 8Ab). Istim početnicama umnožit će se i PCR fragment od 669 pb na svim kopijama retrotranspozona Tpv2i koje se nalaze na T-DNA (Slika 8Aa).

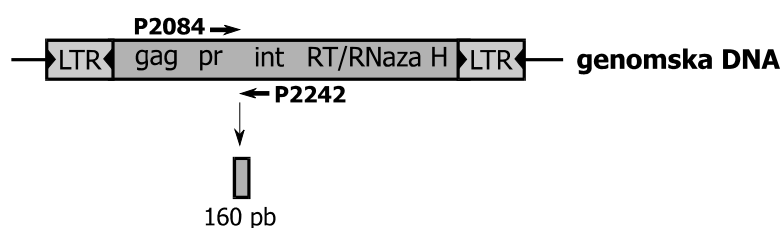
Produkti PCR-a razdvojeni su elektroforezom na agaroznom gelu. U uzorcima DNA linija uročnjaka transformiranih retrotranspozonom Tpv2i utvrđen je isključivo fragment duljine 669 pb, koji odgovara kopijama retrotranspozona na T-DNA (Slika 8B, linije 1-5). Izostanak fragmenta dužine 160 pb ukazuje na zaključak da retrotranspozon Tpv2i nije aktivan. Tri linije uročnjaka transformirane retrotranspozonom Tpv2 poslužile su kao kontrola, budući da su njihovi PCR-produkti veličine 160 pb, bez obzira na aktivnost (Slika 8B, linije 6-8).

A

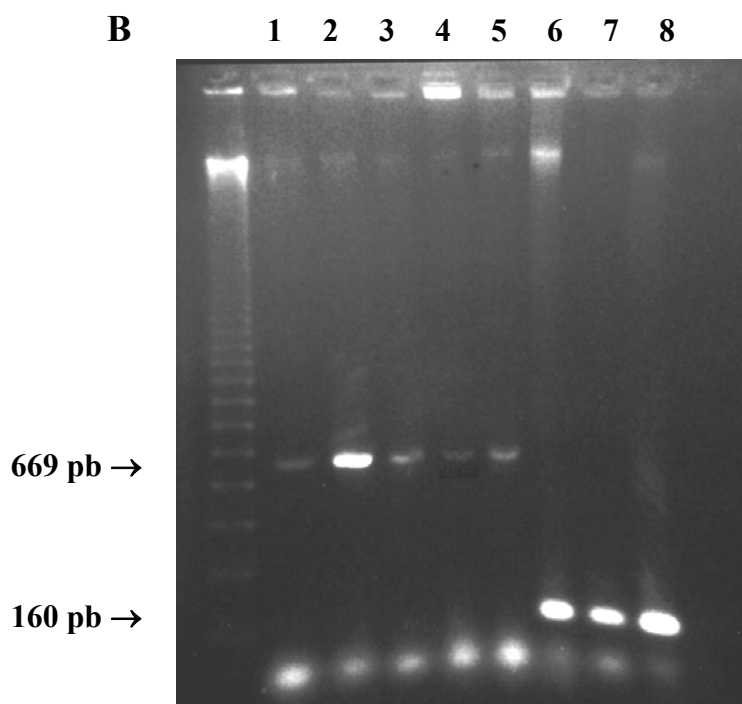
a)



b)



B



Slika 8. A – Shematski prikaz mogućih produkata PCR-a na Tpv2i linijama uročnjaka primjenom početnica P2084 i P22442. a) Ako Tpv2 nije aktivan, rezultirajući PCR-fragment biti će velik 669 pb, jer sadrži kompletan intron. b) Ako je retrotranspozon aktivan intron se izrezuje, novonastala kopija ne sadrži intron, a PCR-produkt je velik 160 pb. B – Rezultat PCR-reakcije na Tpv2i i Tpv2 linijama uročnjaka. Uzorci 1-5 su redom: Col+1, Col+2, Col+3, Col+5, Col+6 i predstavljaju linije uročnjaka transformirane retrotranspozonom Tpv2i. Uzorci 6-8 su redom: Col-1, Col-2, Col-4 i predstavljaju linije uročnjaka transformirane retrotranspozonom Tpv2. Biljeg dužine fragmenata korišten u elektroforezi je satelitna DNA organizma *Tenebrio molitor* (Đurđica Ugarković) i nalazi se u prvoj liniji gela.

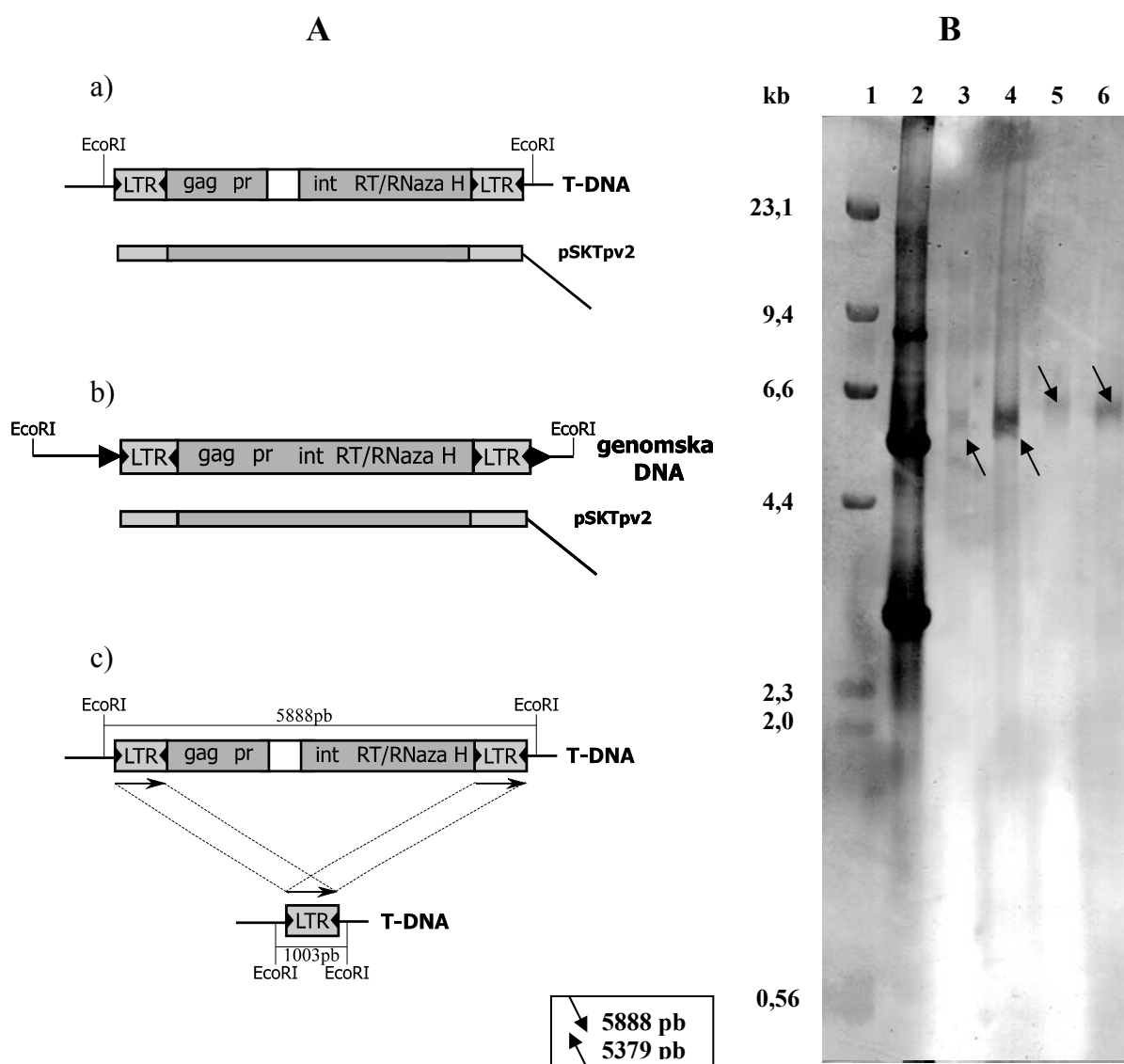
3.3. ANALIZA AKTIVNOSTI RETROTRANSPOZONA Tpv2 I Tpv2i HIBRIDIZACIJOM PO SOUTHERNU

Genomska DNA izolirana iz transgenih biljaka porezana je restrikcijom enzimom EcoRI, fragmenti su razdvojeni na gelu i prebačeni na membranu. Membrana je hibridizirana neradioaktivno obilježenim linearnim plazmidom pSKTpv2.

Transgene linije uročnjaka sadrže u genomu barem po jednu kopiju retrotranspozona Tpv2 ili Tpv2i, koja se nalazi na molekuli T-DNA. Stoga se u svim linijama transformiranih retrotranspozonom Tpv2 očekuje na membrani signal dužine 5379 pb, a u linijama s retrotranspozonom Tpv2i signal dužine 5888 pb (Slika 9Aa). U slučaju aktivnosti retrotranspozona nove kopije će se ugraditi na neko drugo mjesto u genomu, pa će se osim navedenog dobiti i duži signali (Slika 9Ab). Naime, prilikom nove ugradnje, dva susjedna EcoRI mjesta koja omeđuju retrotranspozona biti će više udaljena od rubova elementa u odnosu na njihov položaj u T-DNA.

Hibridizacijom po Southernu dobiven je samo jedan signal u svim analiziranim biljkama, a to je spomenuti EcoRI fragment koji sadrži dio molekule T-DNA (Slika 9B). Taj rezultat upućuje na zaključak da retrotranspozona nije transpozicijski aktivan, jer na membrani nema dužih fragmenata koji bi predstavljali nove kopije ugrađene na druga mjesta u genomu.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bilo je utvrditi je li retrotranspozona Tpv2 stabilno ugrađen u genom uročnjaka, ili se izrezuje iz genoma homolognom rekombinacijom i postoji li razlika u učestalosti homologne rekombinacije između ekotipova Wassilevskia i Columbia. Hibridizacijom po Southernu dobiveni su i podaci o homolognoj rekombinaciji između LTR-ova retrotranspozona Tpv2. U slučaju rekombinacije, očekivani fragment koji sadrži samo jedan LTR umjesto cijelog retrotranspozona bio bi dug oko 1 kb (Slika 9Ac). Izostanak tog fragmenta s membrane (Slika 9B) ukazuje na činjenicu da se homologna rekombinacija između LTR-ova ovog retroelementa u biljci *A. thaliana* ekotipa Columbia nije dogodila. Rezultati istraživanja ekotipa Wassilevskia identični su rezultatima dobivenim analizom ekotipa Columbia.



Slika 9. A – Shematski prikaz mogućih rezultata hibridizacije po Southernu na Tpv2i linijama uročnjaka. a) T-DNA kopije retrotranspozona ugrađene u genomsku DNA transformacijom, hibridizirat će s probom pSKTpv2 i dati signal iste veličine u svim linijama s Tpv2 (5379 pb), kao i Tpv2i (5888 pb) oblikom retrotranspozona. b) Kopije nastale uslijed aktivnosti retrotranspozona oblika Tpv2 i Tpv2i neće sadržavati intron i naći će se na nekom dužem DNA-fragmentu, gdje EcoRI mjesta više ne omeđuju retrotranspozona, već su međusobno udaljenija. c) U slučaju homologne rekombinacije između LTR-ova, retrotranspozona se izrezuje iz genoma, ostavljajući u genomu fragment s jednim LTR-om, veličine 1003 pb. **B – Rezultat reakcije hibridizacije po Southernu na Tpv2i i Tpv2 linijama uročnjaka.** Uzorci 1-6 su redom: biljeg λ HindIII, plazmid pSKTpv2 pocijepan enzimom EcoRI, Col-1, Col-4, Col+2, Col+3. Fragmenti dužine 5888 i 5379 pb, koji odgovaraju EcoRI fragmentima retrotranspozona Tpv2i, odnosno Tpv2, ugrađenih u T-DNA označeni su strelicama. Budući da na membrani nema drugih signala, može se zaključiti da retrotranspozoni Tpv2 i Tpv2i nisu bili aktivni, niti je došlo do homologne rekombinacije između LTR-ova u razini koja se može detektirati ovom tehnikom.

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti aktivnost hibridnog retrotranspozona graha Tpv2 u heterolognom domaćinu, biljci *Arabidopsis thaliana*. Kao heterologni domaćin odabran je uročnjak, jer su u genomu te biljke uspješno aktivirani retrotranspozoni duhana Tnt1 (Lucas i sur., 1995.) i Tto1 (Okamoto i Hirochika, 2000.). Hibridni retrotranspozon Tpv2 sastavljen je iz dijelova dviju nefunkcionalnih kopija izoliranih iz genoma graha (Garber i sur., 1999.). Radi olakšanog utvrđivanja aktivnosti u genomu uročnjaka, u hibridni element ugrađen je intron iz gena za glutamin sintetazu biljke *Lotus japonicus* (Andreas Bachmair, neobjavljeno). Oblici retrotranspozona sa i bez introna, Tpv2i i Tpv2, ugrađeni su u genom stanica korijena uročnjaka ekotipova Wassilevskia i Columbia posredstvom bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Dobivena su četiri tipa transgenih linija uročnjaka: WS+ (ekotip Wassilevskia transformiran retrotranspozonom Tpv2i), WS- (ekotip Wassilevskia transformiran retrotranspozonom Tpv2), Col+ (ekotip Columbia transformiran retrotranspozonom Tpv2i) i Col- (ekotip Columbia transformiran retrotranspozonom Tpv2). Dobivene transgene linije su uzgajane u kulturi tkiva do regeneracije izdanaka i razvoja čitavih transgenih biljaka. Aktivnost retrotranspozona Tpv2 i Tpv2i analizirana je u kalusima lančanom reakcijom polimerazom, te u transgenim biljkama hibridizacijom po Southernu.

Hibridizacijom po Southernu i PCR-om utvrđeno je da se retrotranspozon stabilno ugradio u genom uročnjaka. Istim tehnikama nisu utvrđene nove kopije retrotranspozona niti u jedne transgene linije. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da hibridni retrotranspozon Tpv2 nije bio aktivan u stanicama istraživanih ekotipova uročnjaka.

Izostanak aktivnosti hibridnog retrotranspozona Tpv2 u stanicama uročnjaka može biti posljedica manjkavosti u samoj strukturi elementa. Naime, retrotranspozon Tpv2 je sastavljen od dijelova dviju kopija iz kojih su odstranjene uočene mutacije. Budući da još uvijek znamo relativno malo o ulozi pojedinih sljedova nukleotida retroelementa u njihovu životnom ciklusu, moguće je da hibridni element sadrži mutacije koje ne možemo prepoznati na temelju sadašnjih saznanja o funkcionalnom

redosljediu nukleotida u strukturi LTR-retrotranspozona. Drugi razlog inaktivnosti retrotranspozona Tpv2 mogla bi biti njegova nedovoljna transkripcijska aktivnost. Tako je, na primjer, retrotranspozon riže Tos17 aktivan u svom domaćinu u različitim stresnim uvjetima (Hirochika, 1997., Hirochika i sur., 1996., Yamazaki i sur., 2001.), dok u genomu uročnjaka ne proizvodi nove kopije zbog nedovoljne transkripcijske aktivnosti (Hirochika, neobjavljeno). Dakle, kada bi istraživani hibridni retrotranspozon Tpv2 po samoj sekvenci i bio funkcionalan, možda neki uvjeti u kojima je provedeno ovo istraživanje kao i neki činitelji domaćina, biljke *A. thaliana*, utječu na smanjen broj transkripata, a time i na samu transpozicijsku aktivnost. Daljnje istraživanje koje bi moglo ukazati na uzrok inaktivnosti retrotranspozona Tpv2 bilo bi uspoređivanje količine mRNA retrotranspozona Tpv2 s količinama mRNA retrotranspozona Tnt1 i Tto1, aktivnih u biljci *A. thaliana*, tehnikom "Northern blotting". Na taj način bismo doznali da li je uzrok inaktivnosti retrotranspozona Tpv2 u nedovoljnoj količini mRNA-transkripata, tj. nedovoljnoj transkripcijskoj aktivnosti, ili postoji neki drugi razlog. Također je moguće ugraditi jaki biljni promotor, npr. promotor 35S iz virusa mozaika cvjetače, uzvodno od retrotranspozona Tpv2, kao što je već isprobano na retrotranspozonu Tto1 (Jelenić, 1997.). Ako bi i u tom slučaju izostala aktivnost, razlog tome bismo mogli potražiti negdje unutar samog kodirajućeg dijela retrotranspozona.

Oblik retrotranspozona s ugrađenim intronom, Tpv2i, uvelike je olakšao ovo istraživanje. Naime, proučavajući oblik bez introna, Tpv2, rezultate o aktivnosti mogli bismo dobiti isključivo metodom hibridizacije po Southernu, za što je potrebno izolirati genomsku DNA iz velike količine biljnog tkiva. Ugrađeni intron, u slučaju da se pravilno procesira, omogućuje detekciju aktivnosti vrlo rano nakon transformacije, osjetljivom metodom lančane reakcije polimerazom, koja zahtijeva puno manju količinu biljnog tkiva, odnosno genomske DNA. Tako je već tri mjeseca nakon transformacije izolirana genomaska DNA iz kalusnog tkiva i izdanaka transgenih linija uročnjaka ekotipova Wassilevskia i Columbia, te PCR-om provjerena aktivnost retrotranspozona Tpv2.

Cilj ovog istraživanja bio je i utvrđivanje učestalosti homologne rekombinacije između LTR-ova retrotranspozona Tpv2 u ekotipovima WS i Col-O. U slučaju homologne rekombinacije na gelu bismo mogli detektirati vrpcu veličine oko 1 kb,

koja bi hibridizirala s probom pSKTpv2 i odgovarala EcoRI fragmentu koji sadrži samo jedan LTR (ostatak retrotranspozona se izrezuje rekombinacijom). Hibridizacijom po Southernu nije utvrđena homologna rekombinacija između LTR-ova retrotranspozona Tpv2, što ukazuje da je u oba ekotipa intrakromosomska rekombinacija u ovom slučaju podjednako učestala – ispod razine detekcije upotrebljene tehnike. Kako kod retrotranspozona Tpv2 nije utvrđena homologna rekombinacija, kao ni transpozicijska aktivnost retrotranspozona, dobiveni rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanjima provedenim na retrotranspozonu Tto1. Pokazano je da se u ekotipu Columbia biljke *A. thaliana*, među LTR-ovima svih potencijalno aktivnih retrotranspozona Tto1 dogodila homologna rekombinacija, dok neaktivni nisu rekombinirali (Jelenić, 1997.). Također je pokazano da se retrotranspozon Tto1 ponaša različito u različitim ekotipovima uročnjaka. U biljkama ekotipa Columbia potencijalno aktivni retrotranspozoni izrezuju se iz genoma homolognom rekombinacijom, dok su u biljkama ekotipa Wassilevskia isti retrotranspozoni stabilno ugrađeni u genom i ne rekombiniraju (Jelenić, neobjavljeno). Moguće je da opažanja za retrotranspozon Tto1 vrijede općenito za sve retrotranspozone, budući da su rezultati ovog istraživanja potvrdili da neaktivni retrotranspozoni (retrotranspozon Tpv2) ostaju stabilno ugrađeni u genomu uročnjaka ekotipa Columbia.

5. ZAKLJUČCI

1. Nakon ugradnje hibridnog retrotranspozona Tpv2 u genom uročnjaka ekotipova WS i Col-O nisu utvrđene nove kopije elementa, te se može zaključiti da tijekom provedenih pokusa nisu postignuti svi potrebni uvjeti za aktivnost hibridnog elementa Tpv2, ili hibridni Tpv2 ne sadrži funkcionalne regije potrebne za aktivnost.
2. Hibridni retrotranspozon Tpv2 stabilno je ugrađen u genom uročnjaka ekotipova WS i Col-O. Budući da nisu utvrđene nove kopije elemenata, niti je u ekotipu Col-O utvrđena homologna rekombinacija između LTR-ova, dobiveni rezultati idu u prilog pretpostavci da se mehanizam odgovoran za homolognu rekombinaciju između LTR-ova uključuje prisustvom aktivnih retrotranspozona u genomu uročnjaka ekotipa Col-O.

6. LITERATURA

1. Brandes A, Heslop-Harrison JS, Kamm A, Kubis S, Doudrick RL, Schmidt T (1997) Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of Ty1-*copia*-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. *Plant Mol Biol* **33**:11-21
2. Courtial B, Feuerbach F, Eberhard S, Rohmer L, Chiapello H, Camilleri C, Lucas H (2001) Tnt1 transposition events are induced by in vitro transformation of *Arabidopsis thaliana*, and transposed copies integrate into genes. *Mol Gen Genet* **265**:32-42
3. Feschotte C, Jiang N, Wessler SR (2002) Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature Genet* **3**:329-341
4. Feuerbach F, Drouaud J, Lucas H (1997) Retrovirus-Like End Processing of the Tobacco Tnt1 Retrotransposon Linear Intermediates of Replication. *J Virol* **71**:4005-4015
5. Flavell AJ, Dunbar E, Anderson R, Pearce SR, Hartley R, Kumar A (1992) Ty1-*copia* group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic Acid Res* **20**:3639-3644
6. Flavell AJ, Jackson V, Iqbal MP, Riach I, Waddell S (1995) Ty1-*copia* group retrotransposon sequences in amphibia and reptilia. *Mol Gen Genet* **246**:65-71
7. Garber K, Bilic I, Pusch O, Tohme J, Bachmair A, Schweizer D, Jantsch V (1999) The Tpv2 family of retrotransposons of *Phaseolus vulgaris*: structure, integration characteristics, and use for genotype classification. *Plant Mol Biol* **39**:797-807
8. Grandbastien M-A (1998) Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci* **3**:181-187
9. Grandbastien M-A, Spielmann A, Caboche M (1989) Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature* **337**:376-380
10. Hanin M, Volrath S, Bogucki A, Briker M, Ward E, Paszkowski J (2001) Gene targeting in *Arabidopsis*. *Plant J* **28**:671-677
11. Hirochika H (1993) Activation of tobacco retrotransposons during tissue-culture. *EMBO J* **12**:2521-2528
12. Hirochika H (1995) Regulation of plant retrotransposons and their use for genome analysis. *Gamma Field Symposia* **34**:77-89
13. Hirochika H (1997) Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome analysis. *Plant Mol Biol* **0**:1-10

14. Hirochika H (2001) Contribution of the Tos17 retrotransposon to rice functional genomics. *Curr Opin Plant Biol* 4:118-122
15. Hirochika H, Hirochika R (1993) Ty-*copia* group retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes. *Jpn J Genet* 68:35-46
16. Hirochika H, Okamoto H, Kakutani T (2000) Silencing of Retrotransposons in *Arabidopsis* and Reactivation by the *ddm1* Mutation. *Plant Cell* 12:357-368
17. Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki J, Tsugawa H, Kanda M (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7783-7788
18. Jelenić S (1997) Aktivnost retrotranspozona duhana Tto1 u stanicama vrste *Arabidopsis thaliana* L. Disertacija
19. Katz RA, Skalka AM (1994) The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 63:133-173
20. Konieczny A, Voytas DF, Cummings MP, Ausubel FM (1991) A Superfamily of *Arabidopsis thaliana* Retrotransposons. *Genetics* 127:801-809
21. Kubis S, Schmidt T, Heslop-Harrison JS (1998) Repetitive DNA Elements as a Major Component of Plant Genomes. *Ann Bot* 82:45-55
22. Kumar A (1996) The adventures of the Ty1-*copia* group of retrotransposons in plants. *TIG* 12:41-43
23. Kumar A (1998) The evolution of plant retroviruses: moving to green pastures. *Trends Plant Sci* 3:371-374
24. Kumar A, Bennetzen JL (1999) Plant Retrotransposons. *Annu Rev Genet* 33:479-532
25. Kumar A, Hirochika H (2001) Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. *Trends Plant Sci* 6:127-134
26. Kumar A, Pearce SR, McLean K, Harrison G, Heslop-Harrison JS, Waugh R, Flavell AJ (1997) The Ty1-*copia* group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers. *Genetica* 100:205-217
27. Kunze R, Seadler H, Lönnig W-E (1997) Plant Transposable Elements. *Adv Bot Res* 27:332-436
28. Lucas H, Feuerbach F, Kunert K, Grandbastien M-A, Caboche M (1995) RNA-mediated transposition of the tobacco retrotransposon Tnt1 in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 14:2364-2373
29. Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282:662-682

30. Mhiri C, De Wit PJGM, Grandbastien M-A (1999) Activation of the Promoter of the Tnt1 Retrotransposon in Tomato After Inoculation with the Fungal Pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**:592-603
31. Okamoto H, Hirochika H (2000) Efficient insertion mutagenesis of *Arabidopsis* by tissue culture-induced activation of the tobacco retrotransposon Tto1. *Plant J* **23**:291-304
32. Okamoto H, Hirochika H (2001) Silencing of transposable elements in plants. *Trends Plant Sci* **6**:527-534
33. Pearce SR, Harrison G, Li D, Heslop-Harrison JS, Kumar A, Flavell AJ (1996) The *Ty1-copia* group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation. *Mol Gen Genet* **250**:305-315
34. Plasterk RHA (1993) Molecular Mechanisms of Transposition and Its Control. *Cell* **74**:781-786
35. Pouteau S, Grandbastien M-A, Boccara M (1994) Microbial elicitors of plant defence responses activate transcription of a retrotransposon. *Plant J* **5**:535-542
36. SanMiguel P, Bennetzen JL (1998) Evidence that a Recent Increase in Maize Genome Size was Caused by the Massive Amplification of Intergene Retrotransposons. *Annals of Botany* **82**:37-44
37. SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* **274**:765-768
38. Schnable PS, Hsia A-P, Nikolau BJ (1998) Genetic recombination in plants. *Curr Opin Plant Biol* **1**:123-129
39. Sugimoto K, Takeda S, Hirochika H (2000) MYB-Related Transcription Factor NtMYB2 Induced by Wounding and Elicitors is a Regulator of the Tobacco Retrotransposon Tto1 and Defense-Related Genes. *Plant Cell* **12**:2511-2527
40. Takeda S, Sugimoto K, Otsuki H, Hirochika H (1998) Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon *Tto1* by wounding and methyl jasmonate. *Plant Mol Biol* **36**:365-376
41. Takeda S, Sugimoto K, Otsuki H, Hirochika H (1999) A 13-bp *cis*-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon Tto1 is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. *Plant J* **18**:383-393
42. Thompson HL, Schmidt R, Dean C (1996) Identification and distribution of seven classes of middle-repetitive DNA in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nucleic Acid Res* **24**:3017-3022

43. Voytas DF, Ausubel FM (1988) A *copia*-like transposable element family in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **336**:242-244
44. Voytas DF, Cummings MP, Konieczny A, Ausubel FM, Rodermel SR (1992) *Copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:7124-7128
45. Voytas DF, Konieczny A, Cummings MP, Ausubel FM (1990) The Structure, Distribution and Evolution of the *Ta1* Retrotransposable Element Family of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **126**:713-721
46. Wang S, Liu N, Peng K, Zhang Q (1999) The distribution and copy number of *copia*-like retrotransposons in rice (*Oryza sativa* L.) and their implications in the organization and evolution of the rice genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:6824-6828
47. Wang S, Zhang Q, Maughan PJ, Saghai Maroof MA (1997) *Copia*-like retrotransposons in rice: sequence heterogeneity, species distribution and chromosomal locations. *Plant Mol Biol* **33**:1051-1058
48. Wessler SR (1996) Turned on by stress. *Curr Biol* **6**:959-961
49. Wessler SR, Bureau TE, White SE (1995) LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. *Curr Opin Genet Dev* **5**:814-821
50. White SE, Habera LF, Wessler SR (1994) Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: A role for *copia*-like elements in the evolution of gene structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:11792-11796
51. Wright DA, Ke N, Smalle J, Hauge BM, Goodman HM, Voytas DF (1996) Multiple Non-LTR Retrotransposons in the Genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **142**:569-578
52. 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**:703-715
53. Yamazaki M, Tsugawa H, Miyao A, Yano M, Wu J, Yamamoto S, Matsumoto T, Sasaki T, Hirochika H (2001) The rice retrotransposon *Tos17* prefers low-copy-number sequences as integration targets. *Mol Gen Genet* **265**:336-344