

Retrotranspozon Tto1 kao alat za ciljanu inaktivaciju gena uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*)

Popović, Branka

Master's thesis / Diplomski rad

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:269084>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Branka Popović

Retrotranspozon Tto1 kao alat za ciljanu inaktivaciju gena uročnjaka
(*Arabidopsis thaliana*)

Diplomski rad

Zagreb, 2010.

Ovaj diplomski rad, izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, pod vodstvom prof. dr. sc. Višnje Besendorfer, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Prof. dr. sc. Višnji Besendorfer, voditeljici rada, zahvaljujem na susretljivosti, savjetima i kritičkom čitanju rada.

Dr. sc. Nenadu Malenici zahvaljujem na ukazanom povjerenju, strpljenju, podršci i korisnim savjetima tijekom izrade rada.

Svim profesorima, docentima i asistentima Zavoda za molekularnu biologiju zahvaljujem na susretljivosti i korisnim savjetima.

Hvala mojim prijateljima na pomoći, savjetima i nezaboravnim trenucima studentskih dana!

Hvala mojoj mami na bezgraničnoj ljubavi, razumijevanju i podršci tijekom studiranja!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

RETROTRANSPOZON Tto1 KAO ALAT ZA CILJANU INAKTIVACIJU GENA UROČNJAKA (*Arabidopsis thaliana*)

Branka Popović

Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za molekularnu biologiju,
Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska

Ciljana inaktivacija gena počela se primjenjivati na miševima 80-ih godina prošlog stoljeća. Uspješnost ove strategije temelji se na relativno visokoj učestalosti homologne rekombinacije u somatskim stanicama miša i učinkovitom sustavu pozitivno-negativne selekcije. S druge strane, u biljkama se ugradnja strane DNA odvija pretežno procesom ilegitimne rekombinacije. Ovim radom započeto je istraživanje mogućnosti ciljane inaktivacije gena biljke-modela *Arabidopsis thaliana* (uročnjak) upotrebom retrotranspozona duhana Tto1. Ideja se temelji na manipulaciji procesa reverzne transkripcije, ključnog koraka u životnom ciklusu retrotranspozona, u svrhu proizvodnje supstrata (cDNA) za homolognu rekombinaciju. Transfamacijom bakterijama vrste *Agrobacterium tumefaciens* stvoreno je nekoliko transgenih linija uročnjaka s različitim varijantama retrotranspozona Tto1. Pomoću tih linija željelo se istražiti da li se Tto1 prepisuje u novom domaćinu te da li može završiti životni ciklus s ugrađenim genom biljgom. U slučaju pozitivnog ishoda, pristupilo bi se zamjeni gena biljega za gen uročnjaka koji želimo ciljano inaktivirati. Pokazano je da su sve priređene varijante Tto1 transkripcijski aktivne u uročnjaku, te da se nestabilnost Tto1 binarnih vektora u agrobakterijama, opisana u literaturi, ne ispoljava u uvjetima kratkotrajnog kultiviranja. Također, preliminarni rezultati na temelju fenotipske ekspresije gena biljega pokazali su da Tto1 može završiti životni ciklus. Međutim, dosadašnjim istraživanjima nije se uspjelo dokazati nove kopije Tto1 u genomu uročnjaka.

(64 stranice, 32 slike, 8 tablica, 74 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Arabidopsis thaliana*, uročnjak, ciljana inaktivacija gena, Tto1

Voditelj: Prof. dr. sc. Višnja Besendorfer

Pomoćni voditelj: Dr. sc. Nenad Malenica

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Sandra Radić-Brkanac, Doc. dr. sc. Damjan Franjević

Rad prihvaćen: 15.09.2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

RETROTRANSPOSON Tto1 AS A TOOL FOR GENE TARGETING IN *Arabidopsis thaliana*

Branka Popović

Gene targeting was first applied on mice during the 80-ies of the last century. The success of this strategy is based on a relatively high frequency of homologous recombination in mouse somatic cells and an effective system of positive-negative selection. On the other hand, in plants the integration of exogenous DNA occurs predominantly by illegitimate recombination. In this work we studied the possibility of gene targeting in *Arabidopsis thaliana* using tobacco retrotransposon Tto1. The idea is based on the manipulation of the process of reverse transcription, a key step in the life cycle of retrotransposon, for production of substrate (cDNA) for homologous recombination. By applying *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation several transgenic lines of *A. thaliana* with different variants of retrotransposon Tto1 were created. Using these lines it was explored whether Tto1 was transcribed into the new host, and whether Tto1 can complete the life cycle with an integrated marker gene. In the case of positive outcome, we will approach to replacing gene marker for a gene that we want to specifically inactivate. It was shown that all variants of cloned Tto1 were transcriptionally active and previously described instability of Tto1 binary vectors in *Agrobacterium tumefaciens* didn't manifest itself in short-term cultivation. Preliminary results based on gene marker expression, have shown that a Tto1 can complete its life cycle. However, so far new copies were not detected in the genome of transformed *A.thaliana* plants.

(64 pages, 32 figures, 8 tables, 74 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, gene targeting, Tto1

Supervisor: Dr. Višnja Besendorfer, Associate Professor

Assistant: Dr. Nenad Malenica

Reviewers: Dr. Sandra Radić-Brkanac, Associate Professor; Dr. Damjan Franjević, Associate Professor

Thesis accepted: 15.09.2010.

Sadržaj

1 UVOD	1
1.1 Ciljana inaktivacija gena	1
1.1.1 Homologna rekombinacija	3
1.1.2 Ilegitimna rekombinacija.....	4
1.1.3 Ciljana inaktivacija gena u biljkama	6
1.2 Pokretni genetički elementi	9
1.2.1 LTR-retrotranspozoni.....	12
1.3 Cilj istraživanja	18
2 MATERIJALI I METODE	19
2.1 Materijali	19
2.1.1 Bakterija <i>Escherichia coli</i>	19
2.1.2 Bakterija <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
2.1.3 Biljka <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
2.1.4 Plazmidi.....	19
2.2 Metode.....	23
2.2.1 Kultiviranje biljke <i>Arabidopsis thaliana</i> u uvjetima <i>in vitro</i>	23
2.2.2 Digestija restrikcijskim endonukleazama.....	24
2.2.3 Elektroforeza u agaroznom gelu	24
2.2.4 Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela	25
2.2.5 Ljepljenje/ligacija fragmenata DNA T4 DNA ligazom	25
2.2.6 Transformacija elektrokompetentnih stanica	26
2.2.7 Izolacija plazmidne DNA iz bakterije <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.8 Određivanje slijeda baza u molekuli DNA.....	28
2.2.9 Izolacija plazmidne DNA iz bakterije <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
2.2.10 Transformacija biljaka metodom „ <i>floral dip</i> “	29
2.2.11 Izolacija genomske DNA iz transgenih linija uročnjaka.....	30
2.2.12 Izolacija ukupne mRNA iz transgenih linija uročnjaka	31
2.2.13 Reverzna transkripcija i RT-PCR.....	32
2.2.14 Lančana reakcija polimerazom (PCR)	32
3 REZULTATI.....	34
3.1 Binarni vektori.....	34
3.2 Transformacija bakterije <i>A. tumefaciens</i>	42

3.3 Transformacija biljaka <i>A.thaliana</i>	46
3.4 Analiza transgena u linijama transformiranog uročnjaka.....	47
3.5 Analiza cDNA transgenih linija uročnjaka pomoću metode RT-PCR.....	49
3.6 Detekcija novih kopija Tto1 putem BASTA selekcije.....	51
3.7 Detekcija novih kopija pomoću lančane reakcije polimerazom.....	52
4 RASPRAVA.....	54
5 ZAKLJUČCI.....	58
6 LITERATURA.....	59

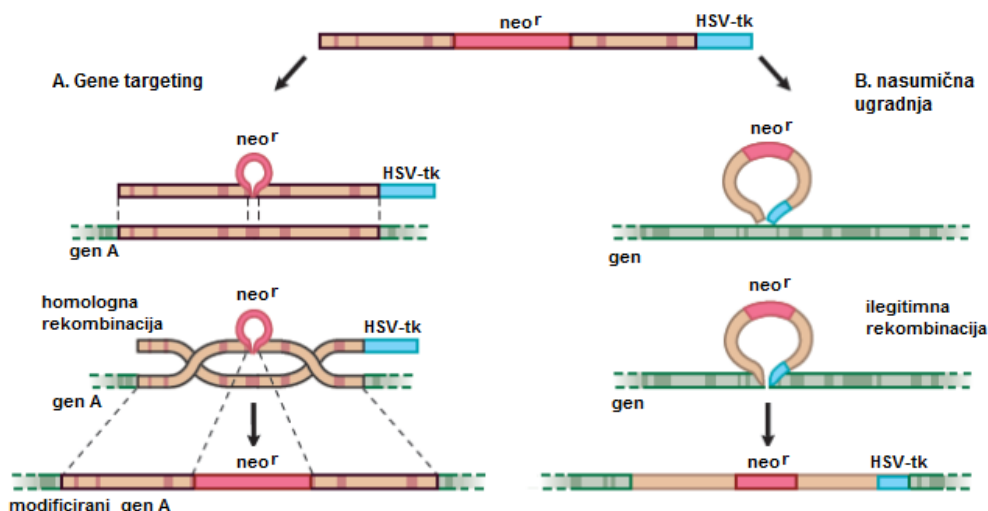
1 UVOD

1.1 Ciljana inaktivacija gena

Ciljana inaktivacija gena, *gene targeting* (GT), je tehnologija koja se zasniva na modifikaciji genomske DNA pomoću dizajnirane sekvence homolognom rekombinacijom (HR). Princip rekombinacije između homolognih gena/DNA slijedova poznat je više od pola stoljeća kada su prva istraživanja rađena na bakterijama. 70-ih godina prošlog stoljeća utvrđeno je da eukarioti koriste iste mehanizme pri izmjeni genetičke informacije između homolognih kromosoma tijekom mejoze (Hansson 2007). U svrhu kontrolirane manipulacije gena, homologna rekombinacija je posebno interesantna jer se mogu predvidjeti nastali produkti. Unošenje strane DNA u homolognu sekvencu genomske DNA omogućava preciznu inaktivaciju ciljanog gena (*gene knock-out*, KO), njegovu modifikaciju, ugradnju novog gena biljega i istovremeno praćenje promjene fenotipa. Nakon proučavanja HR-a na bakterijama i kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (Hinnen i sur. 1978), GT se uspješno počeo primjenjivati na miševima 80-ih godina prošlog stoljeća. Nedavno su se istraživanja proširila i na druge modelne organizme kao što su mahovina *Physcomitrella patens* (Schaefer i Zryd 1997), vinska mušica *Drosophila melanogaster* (Rong i Golic 2000) i ovca (McCreath i sur. 2000) te humane somatske stanice (Hanson i Sedivy 1995).

Uspješnost ove strategije na embrionskim matičnim stanicama (*embryonic stem cell*, ES) sisavaca temelji se na relativno visokoj učestalosti HR-a u somatskim stanicama miša te izrazito učinkovitom sustavu pozitivno-negativne selekcije. Standardni protokol za GT u miševima počinje ugradnjom DNA sekvence u klonirani gen. DNA sekvenca sadrži gen za neomicin fosfotransferazu (*neo*) bez vlastitog promotora te gen za timidinsku kinazu herpes simpleks virusa (*HSV-tk*) na jednom kraju (slika 1.1). Tako skrojena DNA ubacuje se u stanice ES miševa mikroinjiciranjem ili elektroporacijom (Thomas i Capecchi 1987). Slijedi pozitivno-negativna selekcija: preživljavaju stanice otporne na neomicin ili njegov analog G418, što potvrđuje ugradnju u genom, a umiru stanice osjetljive na nukleozidni analog FIAU pri čemu se isključuju stanice s nasumičnom ugradnjom strane DNA. Nakon selekcije stanice se iniciraju u mišje blastociste koje se kirurški unose u ženke prethodno hormonskom terapijom pripremljene za surogat majčinstvo. Nastaju kimerni miševi sa sposobnošću prenošenja promijenjenog genskog lokusa na svoje potomstvo (Capecchi 2001). Razvijena je i

modifikacija metode GT-a, tehnologija Cre-lox. Temelji se na uvođenju mjesta lox^P unutar gena kojeg prepoznaje rekombinaza Cre. Križaju se miš s mjestom lox^P unutar odabranog gena i transgenični miš s reguliranom ekspresijom rekombinaze Cre. Nastaje potomstvo kod kojeg je odabrani gen promijenjen djelovanjem rekombinaze Cre (Hansson 2007).



Slika 1.1. Shematski prikaz A.) ciljane inaktivacije gena homolognom rekombinacijom; i B.) nasumične ugradnje ilegitalnom rekombinacijom. Geni *neo* i *HSV-tk* predstavljaju gene za pozitivno-negativnu selekciju opisanu u tekstu (Hansson 2007).

Mahovina *Physcomitrella patens* (Funariales, Bryophyta) pokazala se kao dobar i jednostavan biljni model za GT i nazvana je zelenim kvascem (Schaefer 2001). U tri neovisna genska lokusa koji postoje u jednoj kopiji u genomu, uneseni su geni za rezistenciju na higromicin ili kanamicin. Efikasnost transformacije protoplasta ove mahovine homolognom rekombinacijom vrlo je visoka za razliku od viših biljaka. Pretpostavlja se da veliku ulogu ima dominacija haploidnog gametofita u životnom ciklusu mahovine (Schaefer i Zrýd 1997) i da je HR dominantan mehanizam radi očuvanja integriteta genoma stanice.

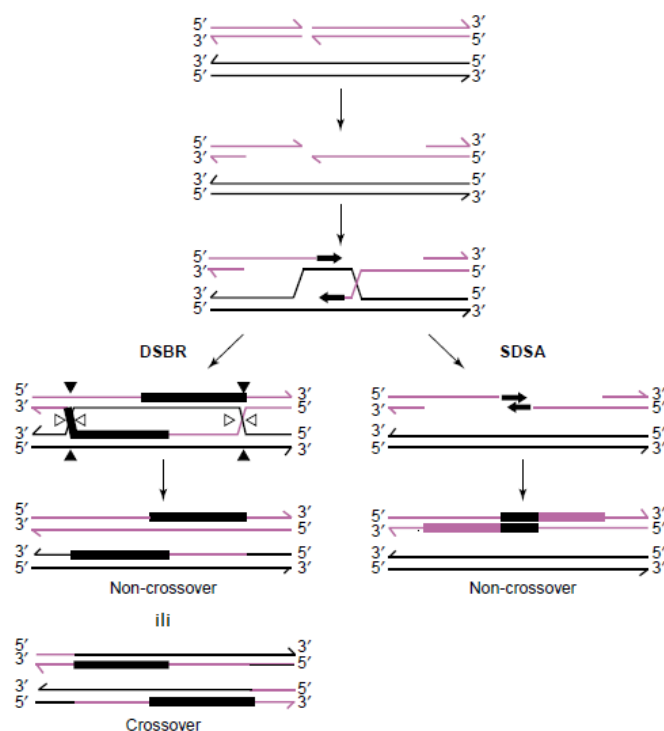
Prvi GT uspjesi na višim biljkama zabilježeni su također 80-ih godina prošlog stoljeća ali tehnologija se nije pokazala toliko pouzdanom i reproducibilnom. Najveći problem je što se strana DNA u stanicama većine višestaničnih organizama ugrađuje nasumično u genom bez obzira na homologne sekvence s kromosomskom DNA (Hanin i sur. 2001). Naime, poznata su tri tipa DNA rekombinacije: homologna, mjesno-specifična (*site-specific*) i

ilegitimna rekombinacija. Sva tri odnose se na popravak dvolančanog loma molekule DNA. Mjesno-specifična rekombinacija otkrivena je u bakterijama, kasnije u kvascu i stanicama sisavaca (T- i B-stanice) dok se u biljnim stanicama odvija samo u plastidnoj i mitohondrijskoj DNA no primjenom sustava *Cre-lox^P* omogućena je primjena i ove vrste rekombinacije u modifikaciji gena (Qin i sur. 1994; Lyznik i sur. 2003).

1.1.1 Homologna rekombinacija

Homologna rekombinacija je dominantna u stanicama prokariota i kvasca (Hanin i Paszkowski 2003). Zahtijeva slijedove DNA koje sadrže homologne regije. Učestalost rekombinacije se povećava s veličinom homolognih regija. Kada se prilikom HR-a ne izgubi niti jedan slijed iz dviju molekula DNA, govorimo u *crossoveru* i rekombinacija je recipročna. Ako samo jedna molekula DNA donira genetsku informaciju bez izmjene, govorimo o genskoj konverziji tj. nerekipročnoj izmjeni. Postoje tri modela HR-a: *single-strand annealing* (SSA), *double-strand break repair* (DSBR) i *one-sided invasion* (OSI). U modelu SSA dvolančani lom (*double strand break*, DSB) se mora dogoditi na obje molekule DNA. Egzonukleaze uklanjaju nukleotide na počecima DSB-a i ostavljaju jednolančane homologne regije. Komplementarni lanci prijanjaju jedni uz druge uz odvajanje nehomolognih preklapajućih regija te slijedi popravak loma. Ovaj mehanizam je nekonzervativan (ostaje samo jedna kimerna molekula DNA) i specifičan je za ekstrakromosomsku rekombinaciju u somatskim stanicama. Model DSBR (slika 1.2) zahtijeva dvolančani lom samo u jednoj molekuli DNA. Egzonukleaze povećavaju lom i ostaje 3' slobodni kraj koji se veže na komplementarnu sekvencu druge molekule DNA i služi kao početnica u DNA popravku. Lom se popravljja donorskom DNA koja služi kao kalup. Nastaju dvije strukture nazvane Hollidayeva veza (*Holliday junction*). One se udaljavaju od inicijalnog mjesta kako napreduje sinteza DNA lanaca. Razrješenje Hollidayevih veza može imati dva ishoda. U prvom slučaju mogu nastati *crossover* rekombinanti ako se cijepaju i ligiraju neukriženi lanci, no ako se cijepaju i ligiraju ukriženi lanci tada ne dolazi do *crossovera* (Schuermann i sur. 2005). Ovaj mehanizam je konzervativan i dobro poznat prilikom mejoze. U trećem modelu, dvolančani lom na akceptorskoj DNA se povećava egzonukleazama te se 3' kraj jedne molekule DNA veže na komplementarnu DNA druge molekule i produžava (slika 1.3).

Istraživanja su pokazala da se rekombinacija u somatskim stanicama viših biljaka odvija preko modela SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*; slika 1.2) (Puchta 2002). Sličan je modelu SSA po invaziji lanca na drugu molekulu DNA no SDSA uključuje i DNA sintezu (Hanin i Paszkowski 2003).



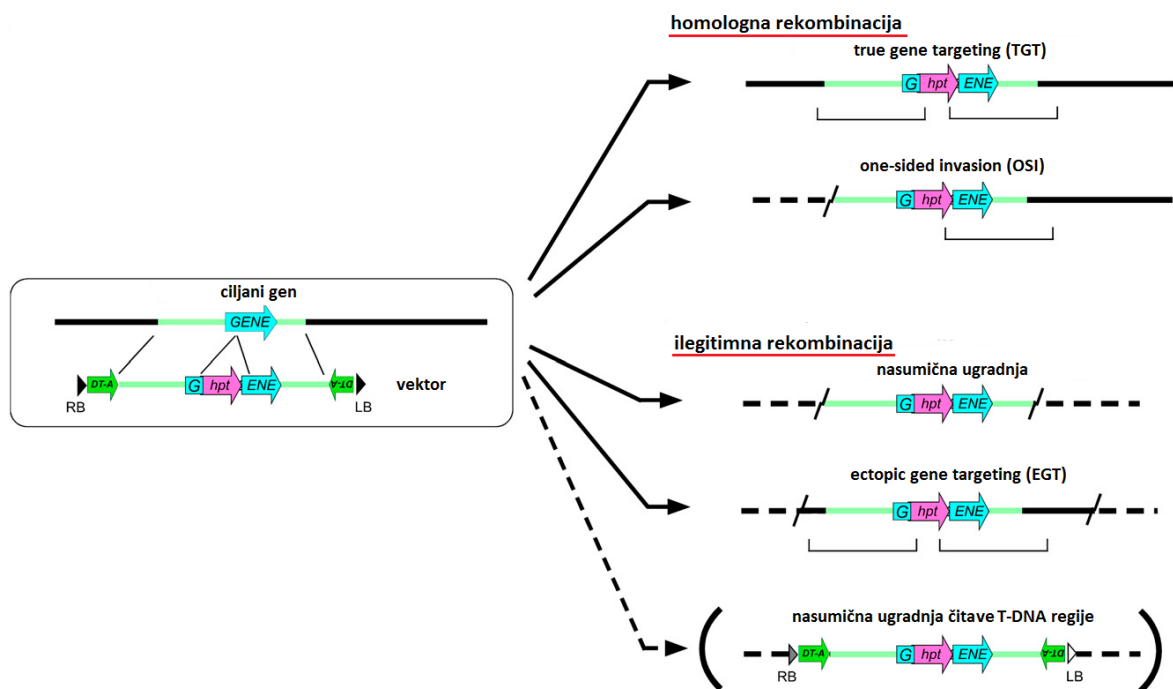
Slika 1.2. Shematski prikaz homologne rekombinacije pomoću dva modela: DSBR (*double strand annealing recombination*) i SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*). Objašnjenje u tekstu (Iida i Terada 2004).

Dužina homolognih sekvenci za uspješan GT ovisi o vrsti modelnog organizma. Nekoliko stotina parova baza (pb) potrebno je kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kod mišjih stanica ES nekoliko tisuća pb, a kod mahovine *Physcomitrella patens* između 2.3-3.6 kb (Schaefer i Zryd 1997).

1.1.2 Ilegitimna rekombinacija

Ilegitimna rekombinacija je najčešći oblik rekombinacije u svim višim biljkama (Hohn i Puchta 1999). To je nehomologna rekombinacija (NHR) i može rezultirati insercijom ili

delecijom DNA sekvence. Opisana su dva mehanizma NHR-a (Bleuyard 2006). *Micro-homology mediated end joining* (MMEJ) je mehanizam koji se temelji na hibridizaciji jednolančanih krajeva DSB-a sa nesavršenom homologijom od 10-ak baza (mikro homologija). Mehanizam popravka *non-homologous end joining* (NHEJ) dominantan je mehanizam popravka dvolančanih lomova putem NHR-a. Ne zahtijeva homologne sekvence i temelji se na ligaciji tupih krajeva ili jednolančanih stršećih krajeva od nekoliko nukleotida.



Slika 1.3. Shematski prikaz mogućih rekombinacija tijekom ugradnje transgena u genom. *DT-A* i *hpt* predstavljaju gene za pozitivno-negativnu selekciju; RB (*right border*) i LB (*left border*) rubove T-DNA regije. Uglate zgrade ispod mapa označavaju fragmente ugrađene mehanizmom *crossover*, a isprekidane i kose crte ugradnju mehanizmom NHEJ (*non-homologous end joining*) (Terada i sur. 2007).

Ilegitimna rekombinacija uključena je i u mehanizam prethodno opisan kao treći tip HR-a tzv. *one-sided invasion*. On rezultira HR-om na jednom kraju i NHEJ-om na drugom kraju (slika 1.3). Postoji još jedan mogući scenarij kombinacijom homologne i nehomologne rekombinacije. To je *ectopic gene targeting* (EGT) koji nastaje NHEJ ugradnjom rekombinantne molekule nastale HR-om između unesenog transgena i kopije ciljanog gena tako da ovaj ostane nepromijenjen (Iida i Terada 2005). U višim biljkama zbog postojanja ektopičkih sekvenci u visokorepetitivnom genomu, mehanizam SDSA omogućuje stabilnost genoma i sprečava moguće translokacije (Puchta 2002).

Pretpostavlja se da su mehanizmi popravka dvolančanog loma, HR i NHEJ, međusobno kompetitivni (Britt i May 2003). Eliminacijom puta NHEJ otvara se nova mogućnost povećanja učestalosti ciljane inaktivacije koja mjeri odnos homologne integracije i nehomologne DNA insercije (Shaked i sur. 2005).

1.1.3 Ciljana inaktivacija gena u biljkama

Posljednjih godina ostvaren je značajan napredak u povećanju postotka HR-a u transformanata uročnjaka *Arabidopsis thaliana* (Shaked i sur. 2005) i riže *Oryza sativa* (Terada i sur. 2007). Problem je međutim u nepostojanju efikasnog sistema pozitivno-negativne selekcije kao što je to slučaj u miša. Detekcija pravih TGT (*true gene targeting*) rekombinanata prilično je spor postupak baziran na PCR-u, hibridizaciji po Southern-u i sekvenciranju.

Razvijena su dva načina stvaranja transgeničnih biljaka. Prvim se DNA direktno unosi u biljnu stanicu pomoću polietilenglikola (PEG), elektroporacijom ili metodom bombardiranja mikročesticama (*particle bombardement*). Drugim se stanica transformira bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* (Puchta 2002).

U eksperimentima je korišten jedan od dva biljega za pozitivnu selekciju: neomicin fosfotransferaza (*nptii*) gen za rezistenciju na kanamicin i geneticin (G418) i higromicin fosfotransferaza (*hpt*) gen za rezistenciju na higromicin B (Hm^r). Također, za negativnu selekciju uzeta su samo dva gena: gen *codA* za citozin deaminazu koja katalizira konverziju netoksičnog 5-fluorocitozina u toksični 5-fluorouracil i gen *DT-A* za difterijski toksični A-fragment koji inaktivira elongacijski faktor 2 (EF2) i biosintezu proteina (Iida i Terada 2005). Još jedan biljeg koristi se za selekciju intrakromosomske rekombinacije (*intrachromosomal recombination* ICR). To je gen za β -glukuronidazu (*GUS*). Konstrukti sadrže dijelove gena u istoj ili obrnutoj orijentaciji tako da on postaje aktivan tek nakon ICR-a (Endo i sur. 2006).

Prvi uspješan i reproducibilan GT bez pojave ektopičkih rekombinacija, zabilježen je na riži, *Oryza sativa* L. (Iida i Terada 2004). Ova jednosupnica izuzetno je važna jer kao žitarica čini osnovnu prehrambenu namirnicu za više od pola svjetskog stanovništva i modelni

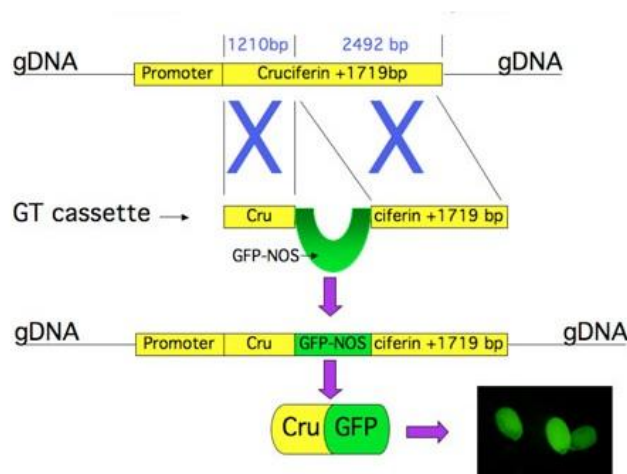
je organizam s genomom veličine 389 Mb (Terada i sur. 2007). Kalusno tkivo transformirano je bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*. Ciljani gen *Waxy* kodira škrobnu sintetazu vezanu za škrobne granule, ključni enzim u sintezi amiloze. Nalazi se na 6. kromosomu i prisutan je samo u jednoj kopiji (Iida i Terada 2005). Mutacija gena utječe na kvalitetu i kvantitetu zrna riže i fenotip se lako može pratiti bojanjem jodom (Terada i sur. 2002). Pozitivni biljeg je gen *hpt* a negativni gen *DT-A*. Gen *DT-A* korišten je i u negativnoj selekciji mišjih stanica ES (Yagi i sur. 1990) gdje je bila dovoljna samo jedna kopija tog gena. U slučaju riže bile su potrebne dvije kopije gena *DT-A* na oba kraja T-DNA zbog mogućih delecija na krajevima pri ilegitalnoj ugradnji (Terada i sur. 2004). Problem s genom *DT-A* je to što se može sintetizirati toksin ako se gen prepíše s dvolančane T-DNA prije ugradnje i tako ubije potencijalne transformante. U stanicu T-DNA ulazi kao jednolančana DNA na čiji je 5' kraj kovalentno vezan protein VirD2. No, u jezgri prije ugradnje u genom, T-DNA postaje dvolančana. Pretpostavlja se da uspješnom GT-u prethode jednolančani lomovi u homolognim regijama jednolančane T-DNA prije nego ona postane dvolančana. Kako su oba gena *DT-A* na krajevima T-DNA (na 5' kraju ispred homologne regije i na 3' kraju iza) time je spriječena ekspresija gena prije ugradnje u genom (Iida i Terada 2005).

Nakon uspješne inaktivacije gena *Waxy*, pozitivni rezultati dobiveni su i modifikacijom gena koji je u genomu prisutan u više kopija. To je gen *Adh2* koji kodira alkohol dehidrogenazu 2. U rižinom genomu geni *adh* su prisutni u 4 kopije: *Adh1*, *Adh2*, *Adh3* na 11. i *Fdh1* na 2. kromosomu. Alkohol dehidrogenaza ima ključnu ulogu u preživljavanju u anaerobnim uvjetima. Nizvodno od lokusa *Adh2*, nalazi se i kopija visokorepetitivnog retroelementa *Copia-like* (Terada i sur. 2007). Pozitivno-negativna selekcija se temeljila na genima *hpt* i *DT-A*. Učestalost GT događaja bila je usporediva s učestalosti inaktivacije gena *Waxy* što pokazuje da je strategija primjenjiva i na druge lokuse.

Uročnjak *Arabidopsis thaliana* je manje važna korovna vrsta iz porodice *Brassicaceae*, široko rasprostranjena u Europi, Aziji i Sjevernoj Americi, ali zato iznimno važna biljka-model. Vrlo je pogodna za genetička istraživanja jer ima najmanji genom (125 Mb) među višim biljkama čija je sekvenca u potpunosti poznata, najmanje repetitivnih sekvenci, kratko generacijsko vrijeme (5-6 tjedana u optimalnim uvjetima) i visoku plodnost (do 10 000 sjemenki po biljci). Mutantne linije je lako održati samooprašivanjem (Page i Grossniklaus 2002). Do sada je GT-om uspješno modificirano nekoliko gena uročnjaka. Prvi

knock-out gen bio je *AGL5* (Kempin i sur. 1997) koji kodira transkripcijski faktor *MADS box*. Izolirana je samo jedna biljka od 750 transformanata u kojoj je *AGL5* inaktiviran genom *nptii*. Kasnije je uspješno inaktiviran gen *PPO* za protoporfirinogen oksidazu. Gen *PPO* je uključen u sintezu klorofila i hema jer oksidira protoporfirinogen IX u protoporfirin što je zadnji korak sinteze. U kloroplastima je meta za nekoliko herbicida koji blokiraju enzim. Protoporfirinogen IX se nakuplja i izlazi u citoplazmu gdje se oksidira nespecifičnim peroksidazama. Na svjetlu nastaje reaktivni singletni kisik koji uzrokuje smrt stanice. GT-om su uvedene dvije mutacije u gen pa stanice postaju rezistentne na herbicid Butafenacil što predstavlja još jedan način selekcije GT događaja (Hanin i sur. 2001).

Iako je napredak postignut i dalje se ulažu veliki naponi u stvaranju dobre strategije za GT. Proučavaju se i enzimi uključeni u HR i točni mehanizmi rekombinacije. Tako je overekspresijom kvašćevog gena *Rad54* u uročnjaku, dobivena veća učestalost GT-a. Gen *Rad 54* je dio *Swi2/Snf2* kromatinske remodelirajuće genske porodice koja sadrži 40 gena čiji produkti imaju konzervirane ATPazne/helikazne motive dužine ~400 aminokiselina (Shaked i sur. 2006). Pretpostavlja se da *Rad54* ima ulogu u invaziji lanca tijekom HR-a (Shaked i sur. 2005). Uveden je i novi pozitivni biljeg, GFP (*green fluorescent protein*) koji se ugrađuje u gen za Cruciferin, protein što se pohranjuje u sjemenkama (slika 1.4), tako da se u konačnici dobiva fluorescentno sjeme (Puchta i Hohn 2005).



Slika 1.4. Shematski prikaz ciljane inaktivacije gena u stanicama uročnjaka *A.thaliana*. GFP je gen za zeleni fluorescentni protein koji se homolognom rekombinacijom ugrađuje u *Cruciferin*, gen za spremišni protein, te daje fluorescentno sjeme (Shaked i sur. 2005).

Povećanje učestalosti HR-a i integracije T-DNA dobiveno je uvođenjem mutacije u gene *fas1* i *fas2*, čiji produkti su (uz *msi1*) podjedinice CAF-1 (*chromatin assembly factor 1*). CAF-1 posreduje u stvaranju nukleosoma (nakupljanju H3/H4 histona) nakon DNA replikacije i popravku nukleotidnog izrezivanja (*nucleotide excision repair*, NER) (Endo i sur. 2006).

Uvođenje dvolančanih lomova također povećava učestalost HR-a. Jedan način je ugradnja restriksijskog mjesta za rijetku endonukleazu *I-SceI*, ali ograničava *targeting* na samo to mjesto (Li i sur. 2007). Drugi način uključuje kromosomske lomove pomoću nukleaza nazvanih *zinc-finger endonuclease*, ZFN. *Zinc finger* je peptid od ~30 aminokiselina stabiliziran cinkovim ionom. Za DNA triplete se veže 3-4 *zinc finger*a (Kumar i sur. 2006). S njima fuzionira restriksijska endonukleaza tipa II, *FokI*, koja je aktivna samo kao dimer što zahtijeva blizinu mjesta koja prepoznaju ZFN kako bi inaktivni monomeri dali funkcionalan enzim (Wright i sur. 2005). ZFN se može modificirati tako da *zinc finger* prepozna točno određeni DNA triplet. Manipulacijom takvih nukleaza omogućeno je uvođenje dvolančanih lomova na bilo kojem mjestu u genomu, npr. na početku i kraju egzona ciljanog gena (Kim i sur. 1996). Do sada su nukleazama ZFN uspješno uvedeni dvolančani lomovi u genomu kukuruza *Zea mays* (Shukla i sur. 2009).

Daljnja istraživanja pokušavaju odgovoriti na mnoga pitanja koja su se nametnula i optimizirati uvjete za uspješan GT, poput onog u miševa. Pretpostavlja se da je HR ovisna o staničnom ciklusu i najizraženija u S fazi, da je heterokromatin inhibira, da se njena učestalost smanjuje sa starosti biljke zbog točkastih mutacija, da su linearne molekule bolji supstrati za HR od cirkularnih te da se dužim homolognim slijedovima isključuje mogućnost EGT-a. U novije vrijeme pokretni genetički elementi predstavljaju bitan genetički alat u funkcionalnoj analizi biljnog genoma. Primjenu su našli u tehnologiji molekularnih biljega, određivanju filogenije i genske raznolikosti te ciljanoj inaktivaciji gena (Kumar i Hirochika 2001).

1.2 Pokretni genetički elementi

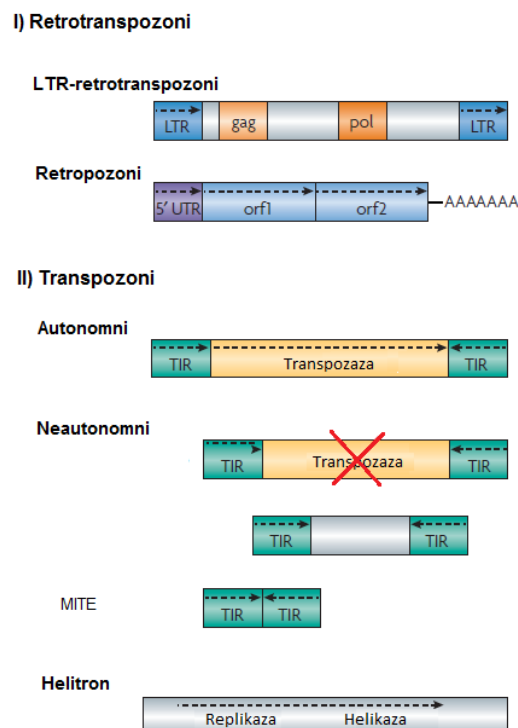
Pokretni genetički elementi su slijedovi nukleotida u molekuli DNA koji mogu mijenjati svoje mjesto u genomu. Sadrže od nekoliko stotina do više od deset tisuća parova nukleotida. Pronađeni su u svim carstvima pa tako i u svim proučavanim eukariotskim

vrstama osim u parazitske praživotinje *Plasmodium falciparum* (Wicker i sur. 2007). U eukariotima su obično raspršeni po genomu, a broj im varira od nekoliko do preko milijun kopija, ovisno o tipu elementa i vrsti organizma. U biljkama je pronađeno nekoliko tisuća različitih elemenata. Kod nekih vrsta iz porodice *Liliaceae* zauzimaju i do 90 % ukupne genomske DNA dok kod vrste *Arabidopsis thaliana* samo 15 % (Sabot i Schulman 2006). U carstvu *Fungi* čine 3-20 % genoma, u podcarstvu *Metazoa* 3-45 %, a kod čovjeka čine skoro polovicu genoma.

Kako se ne zna njihova točna funkcija osim vlastitog umnažanja i ponovne ugradnje u genom, u početku su smatrani "sebičnom DNA" ili "ultimativnim parazitima" (Miller i Capy 2004). Danas se zna da mogu uzrokovati kromosomske mutacije: delecije, inverzije i translokacije; pa se smatra da su imali, i još uvijek imaju, središnju ulogu u evoluciji i strukturi genoma te njegovoj plastičnosti (Kumar i Bennetzen 2000). Utjecali su i na varijacije u veličini genoma mnogih vrsta (Vicient i sur. 2001). Pronađeni su u svim dijelovima genoma od pericentromernog heterokromatina, telomera, regulatornih regija do egzona i introna. Teoretski, mogu se ugraditi u bilo koje mjesto u genomu no najviše ih ima u heterokromatinu i regulatornim regijama (Miller i Capy 2004). Ugradnja u promotorsko mjesto može djelovati na ekspresiju dok ugradnju u kodirajuću regiju može inaktivirati gen. Pretpostavlja se da su domaćini razvili obrambene mehanizme za regulaciju širenja pokretnih elemenata kao što su metilacija, heterokromatizacija i kosupresija: transkripcijskim i post-transkripcijskim "utišavanjem" gena (Feschotte i sur. 2002).

Pokretni genetički elementi su podijeljeni u dva glavna razreda: retrotranspozoni (RNA- ili retroelementi) i transpozoni (DNA-elementi). Razlikuju se s obzirom na strukturu (slika 1.5) i mehanizam premještanja u genomu. Transpozoni se uglavnom premještaju direktno izrezivanjem (mehanizam *cut and paste*) iz jednog mjesta u genomu i integracijom u neko drugo mjesto. Proces katalizira transpozaza koja se veže za krajeve transpozona, terminalna obrnuta ponavljanja (*terminal inverted repeats* TIR). Retrotranspozoni se premještaju posredno, reverznom transkripcijom molekule RNA i ugradnjom cDNA u genom (mehanizam *copy and paste*). Ponekad se i transpozoni mogu replicirati tako da jedna kopija ostane ugrađena u izvorni lokus (Wicker i sur. 2007).

Retrotranspozoni se po Capyju (1997) dijele u dva podrazreda: LTR-retrotranspozone i retropozone. Retropozoni ne sadrže duge ponavljajuće slijedove (*long terminal repeats*, LTR) i završavaju poliA-repom. Imaju drugačiji mehanizam reverzne transkripcije od LTR-retrotranspozona jer se proces odvija na genomskoj DNA i ona služi direktno kao početnica (*primer*). Dijelev se na dvije skupine: LINE (*long interspersed nuclear element*) i SINE (*short interspersed nuclear element*). Elementi LINE imaju dva ORF-a (*open reading frame*): jedan kodira protein koji se veže za DNA a drugi endonukleazu i reverznu transkriptazu (Kazazian 2004). Elementi SINE su neautonomni jer nemaju kodirajuće sekvence i koriste reverznu transkriptazu od LINE. S obzirom da se stalno otkrivaju novi pokretni elementi koji se ponekad ne mogu uvrstiti u nijednu definiranu skupinu, javlja se potreba za novim klasifikacijama. Hull je 2001. predložio klasifikaciju koja se temelji na virusnoj nomenklaturi (Capy 2005).



Slika 1.5. Shematski prikaz strukture pokretnih genetičkih elemenata (razreda I i II). LTR (*long terminal repeats*) predstavljaju duge ponavljajuće slijedove; *gag* i *pol* otvorene okvire čitanja (*open reading frames*, ORF) LTR-retrotranspozona; 5'UTR (*untranslated region*) netranslatirajuće regije; TIR (*terminal inverted repeats*) terminalna obrnuta ponavljanja; MITE (*miniature inverted-repeat transposable elements*) minijaturne pokretne elemente s obrnutim ponavljanjima (Slotkin i Martienssen 2007).

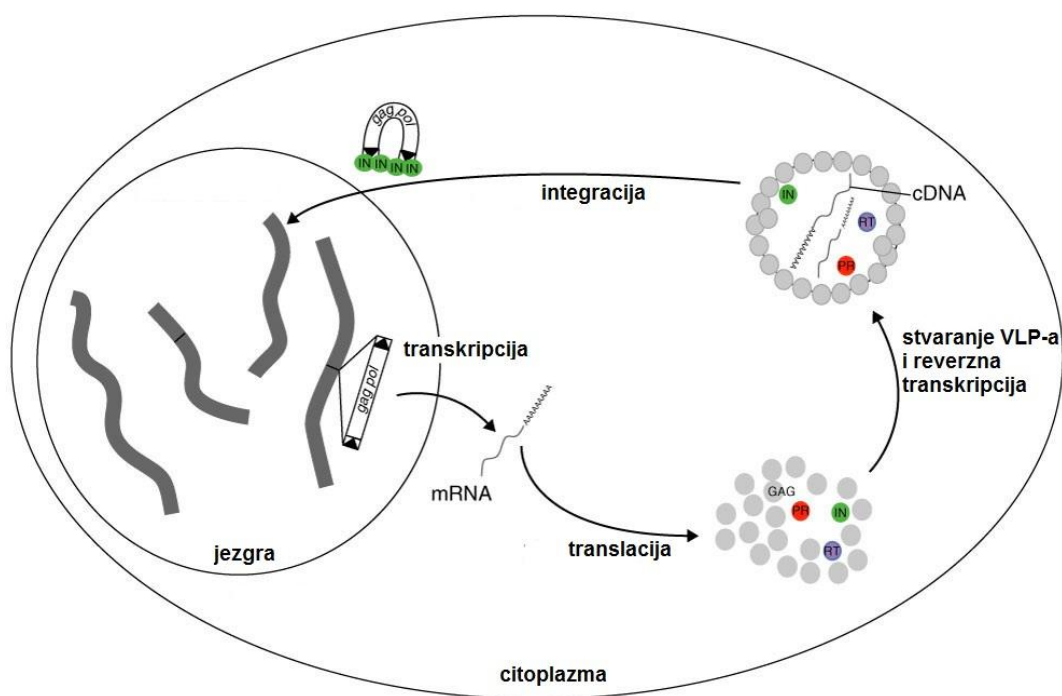
1.2.1 LTR-retrotranspozoni

LTR-retrotranspozoni čine najveću komponentu većine biljnih genoma (Pearce i sur. 1999). Najkraći poznati retroelement Ty5 iz kvasca *S. cerevisiae* dugačak je 3,2 kb, a najdulji je 22 kb velik element Ogre pronađen u grašku (*Pisum sativum*). Broj kopija elementa u genomu ovisi o vrsti domaćina. Tako u genomu kukuruza *Zea mays*, postoji 1-5 kopija elementa Bs1, dok genom vrste *Hordeum spontaneum* može sadržavati od 5 000 - 22 000 kopija elementa BARE-1 (Feschotte i sur. 2002).

LTR-retrotranspozoni imaju LTR-ove na krajevima elemenata (u istoj orijentaciji) i između njih jedan ili nekoliko otvorenih okvira čitanja (*open reading frame*, ORF), u kojima se nalaze kodirajuće regije za proteine uključene u životni ciklus elementa. Najčešće imaju dva ORF-a: *gag* i *pol*. *Gag* kodira strukturni protein, a *pol* sadrži nekoliko gena i to za proteazu (PR), integrazu (INT), reverznu transkriptazu (RT) i ribonukleazu H (RNaza H). Prema redoslijedu kodirajućih regija unutar ORF-a *pol* LTR-retrotranspozoni su podijeljeni u dvije podskupine: Ty1-*copia* i Ty3-*gypsy*. Elementi Ty1-*copia* sadrže gene u *pol* regiji u napisanom redoslijedu dok je u elementima Ty3-*gypsy* gen za integrazu iza gena za RNazu H tj. na kraju regije *pol*. Retrotranspozoni Ty3-*gypsy* najviše sličje retrovirusima ali ne sadrže gen *env* za protein ovojnice retrovirusa, bitan za njihovu infektivnost. Međutim nađeni su elementi *gypsy* sa sekvencama koje sličje genu *env* što ide u prilog teoriji da su imali zajedničkog pretka s retrovirusima (Kumar 1998).

1.2.1.1 Životni ciklus

Većinu onoga što znamo o mehanizmima LTR retrotranspozicije dolazi iz rada na retrotranspozonima Ty1 u kvascu *S. cerevisiae* no smatra se da su mehanizmi vrlo slični i u ostalim LTR-retrotranspozonima iz različitih vrsta domaćina (Havecker i sur. 2004). Životni ciklus se može podijeliti u nekoliko koraka: transkripcija, translacija, stvaranje čestica sličnih virusima (*virus like particles*, VLP), reverzna transkripcija, prijenos kopije u jezgru i integracija u genom domaćina (slika 1.6).



Slika 1.6. Shematski prikaz životnog ciklusa LTR-retrotranspozona. *Gag* i *pol* predstavljaju otvorene okvire čitanja: *gag* kodira strukturni protein (GAG), podjedinicu VLP-a (*virus like particles*); a *pol* sadrži nekoliko gena i to za proteazu (PR), integrazu (INT) i reverznu transkriptazu (RT) (Havecker i sur. 2004).

Prvi korak počinje transkripcijom retrotranspozona pomoću stanične RNA polimeraze II. Signali za početak i završetak transkripcije nalaze se u LTR-ima. LTR-i mogu biti dugački od nekoliko stotina pb do više od 5 kb (Wicker i sur. 2007). Svaki LTR čine tri regije: U3 (*unique 3'RNA*), R (*repeated RNA*) i U5 (*unique 5'RNA*) (Manetti i sur. 2007). Također, svi započinju s 5'-TG-3' a završavaju s 5'-CA-3'. Transkripcija započinje u 5'LTR-u, nizvodno od TATA-box sekvence, na granici između U3 i R regije a završava u 3'LTR-u, između R i U5 (Grandbastien 1998). Retrotranspozoni i njihove mRNA nemaju introne. Nastale RNA služe kao kalupi za translaciju i za reverznu transkripciju.

Translacija se odvija u citoplazmi stanice. *Gag* kodira strukturni protein koji gradi VLP-ove i potreban je u velikim količinama (~300 jedinica za jednu česticu) tako da je kontroliran stehiometrijski omjer *gag:pol* tijekom sinteze proteina. Retroelementi najčešće imaju dva otvorena okvira čitanja koja su razmaknuta za jedan nukleotid (-1 *frameshift* češći nego +1), stop kodonom ili čak malim repetitivnim motivom (AAAAA). Translacijski

mehanizmi to mogu i ignorirati pa nastaje fuzioniran poliprotein Gag-Pol što je često u biljkama. Za dobar omjer potreban je u takvim slučajevima *splicing* transkripta ili diferencijalna degradacija proteina (Sabot i Schulman 2006).

U proteinu Gag identificirane su dvije funkcionalne domene: kapsidna i nukleokapsidna. Kapsidna je bitna za Gag polimerizaciju, stvaranje čestica VLP i smatra se da je na C-terminusu proteina. Nukleokapsidna je odgovorna za interakciju s nukleinskim kiselinama odnosno posreduje u pravilnom pakiranju 2 molekule RNA unutar VLP-a. Signalna sekvenca za pakiranje (*packaging signal*, PSI), unutar RNA molekule se nalazi na njenom 5' kraju, prije ORF-a *gag* i tvori sekundarnu strukturu. U kvascu je utvrđeno da se element Ty1 pakira kao nekovalentni dimer što je karakteristično za retroviruse (Sabot i Schulman 2006). U VLP se pakiraju i proteini PR, INT, RT i RNaza H u obliku poliproteina Gag-Pol što osigurava interakcija između Gag-dijela ovog poliproteina s proteinom Gag. Također je potrebna tRNA domaćina koja služi kao kalup za reverznu transkripciju i specifična je za svaki element. Svi poznati retrotranspozoni u biljkama koriste tRNA_i^{Met} kao početnicu (Wicker i sur. 2007).

Reverzna transkripcija se odvija u VLP-ima u citoplazmi. Prije samog procesa, enzimi se moraju osloboditi iz poliproteina Gag-Pol što katalizira proteaza koja je i sama dio tog poliproteina. To je aspartat proteinaza jer u aktivnom mjestu svih poznatih retrovirusa i retrotranspozona sadrži triplet Asp-Thr/Ser-Gly. Djeluje kao dimer. Prvi korak reverzne transkripcije je vezanje 3' kraja tRNA za PBS (*primer binding site*) sekvencu. To je slijed od 20 do 25 nukleotida koji se nalazi između 5'LTR-a (2-3 pb nizvodno) i *gag*-a na mRNA i služi kao mjesto gdje počinje sinteza (-)cDNA lanca. Lanac se sintetizira prema 5' kraju LTR-a i proces katalizira reverzna transkriptaza. Ta parcijalna (-)cDNA nazvana je *strong stop* DNA i sadrži regije R i U5. 5' kraj kalupa razgrađuje se uz pomoć RNaze H te omogućuje premještanje (-) lanca cDNA na 3' kraj kalupa gdje se vežu komplementarne R regije. Sinteza DNA lanca se nastavlja do kraja kalupa. RNaza H razgrađuje kalup ali ostaje sačuvan jedan fragment, nazvan PPT (*polypurine tract*) koji služi kao početnica za sintezu drugog, (+) lanca DNA na kalupu (-) lanca. PPT je sekvenca duljine 20 do 25 nukleotida, uglavnom s purinskim bazama i nalazi se na 5' kraju 3'LTR-a. Sinteza dijela (+)cDNA završava kad RT prepíše dio tRNA komplementaran PBS-u. Početnica (-) lanca se odvaja a (+) lanac se premješta na 3' kraj (-) lanca gdje dolazi do sparivanja u regiji PBS te se nastavlja sinteza. Nastaje dvolančana

cDNA s cijelim LTR-ovima na krajevima. U svih istraženih RT, RNaza H je sastavni dio enzima, tako da je RT višefunkcionalni enzim jer djeluje kao: RNA-ovisna DNA polimeraza, ribonukleaza H i DNA-ovisna DNA polimeraza. RT je najkonzerviraniji enzim u retrotranspozonima (Havecker i sur. 2004) pa i sam proces reverzne transkripcije nije specifičan za određenu RNA već se bilo koja RNA može prepisati unutar VLP-a. Ovaj korak je sklon pogreškama jer RT nema *proofreading* aktivnost već nastavlja sintezu lanca i nakon što se ugradi pogrešan nukleotid. Enzim slabo prepoznaje pogrešne ribonukleotide, nema 3' i 5' egzonukleaznu aktivnost te dopušta proklizavanje početnica na dugim repetitivnim slijedovima. Pogreške tijekom reverzne transkripcije mogu doprinijeti nastanku novih populacija pokretnih elemenata (Grandbastien 1998).

Nova kopija retroelementa se ugrađuje u genom uz pomoć integraze ali još uvijek se ne zna točan mehanizam prijenosa cDNA u jezgru stanice. Integraza na N-terminusu ima *Zn finger* za vezanje DNA, u katalitičkom mjestu DDE motiv dok je C-terminus jako heterogen pa se pretpostavlja da je bitan za vezanje na mjesto integracije. Enzim ima endonukleaznu aktivnost pa reže i genomsku i cDNA. Signal INT u retrotranspozonima je oko 25 nukleotida dugačka sekvenca koja se nalazi na 3' kraju LTR-ova. S obzirom da su PBS i PPT za nekoliko parova baza razmaknuti od susjednih LTR-ova, ti nukleotidi čine višak na krajevima cDNA. Integraza ih uklanja na 3' krajevima te nastaju hidroksilne 3'-OH skupine koje rade nukleofilne napade na fosfate u genomske DNA. Integraza cijepa DNA (dvolančani lom) u obliku 4 do 6 pb dugog zareza. Nakon vezanja s genomskom DNA, odstranjuju se nukleotidi na 5' krajevima retrotranspozona a popravljaju komplementarni lanci DNA domaćina na rubovima elementa. Nastaju duplikacije (*target site duplication*, TSD) od 4 do 6 pb u izravnoj/direktnoj orijentaciji oko ugrađenog retrotranspozona. Dužina TSD-a je karakteristična za svaki pokretni element (Kazazian 2004).

Način na koji integraza prepoznaje ciljano mjesto u genomu nije dovoljno istražen. LTR-retrotranspozoni su najčešće locirani u intergenskim regijama no u kukuruzu je većina pomiješana s genskim regijama. Mnogi se LTR-retrotranspozoni ugrađuju u relativno specifična mjesta kao što je slučaj s Ty3 u kvascu koji se nalazi nekoliko nukleotida udaljen od inicijacijskog mjesta transkripcije RNA polimeraze III (Kazazian 2004) dok neki visokorepetitivni elementi preferiraju ugradnju u već postojeće kopije u genomu (Kumar i Bennetzen 2000).

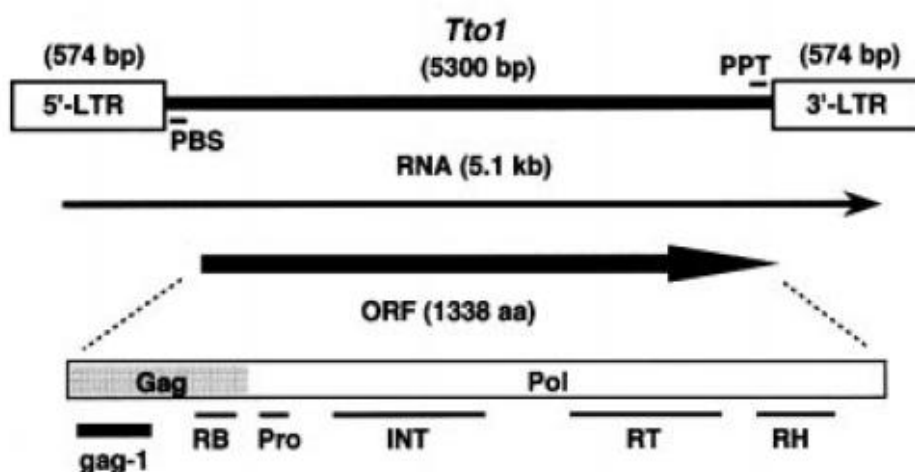
Bez obzira što su prisutni u vjerojatno svim biljnim vrstama i što čine znatan udio u njihovim genomima, samo mali broj retrotranspozona je aktivan. Inaktivnost je većinom posljedica defektnih struktura uzrokovanih točkastim mutacijama i delecijama, ili različitim mehanizmima utišavanja gena koje posjeduje domaćin. Do danas je nađeno samo tri aktivna retrotranspozona iz skupine Ty1-*copia*: Tnt1 i Tto1 u duhanu i Tos17 u riži (Hirochika i sur. 1996). No i njihova aktivnost se inducira tek u različitim stresnim uvjetima. Pretpostavlja se da je genetička varijabilnost, kao posljedica te aktivnosti, mehanizam prilagodbe na uvjete stresa (Takeda i sur. 1998). Neki retroelementi su se pokazali aktivnima u stanicama gerimantivne linije (*germ line*; Böhmendorfer i sur. 2005).

1.2.1.2 Retrotranspozon Tto1

Retrotranspozon Tto1 jedan je od tri aktivna retroelementa grupe *copia* u biljkama. Otkriven je u stanicama duhana koje sadrže oko 30 kopija ovog elementa (Böhmendorfer i sur. 2008). Dugačak je 5300 pb, što uključuje dva LTR-a dužine 574 pb i jedinstveni ORF koji kodira poliprotein dužine 1338 aminokiselina (slika 1.7). Analizom redoslijeda nukleotida ORF-a utvrđene su konzervirane sekvence karakteristične za gene koji kodiraju strukturni protein Gag, te enzime PR, INT i RT/RH (Hirochika 1993; Hirochika i sur. 1996). Omjer gag:pol je najvjerojatnije reguliran post-transkripcijskim mehanizmom. Čestice VLP su veličine približno 30 nm (Böhmendorfer i sur. 2008).

Retrotranspozon Tto1 je, kao i drugi aktivni retrotranspozoni u biljaka, neaktivan u normalnim uvjetima rasta i razvoja biljke, a aktivira se u određenim stresnim situacijama kao što su izolacija protoplasta, stanična kultura, virusna infekcija, mehaničko ranjavanje i tretmani salicilnom kiselinom ili (metilnim) jasmonatom (Takeda i sur. 1998). U navedenim uvjetima broj kopija elementa u genomu povećava se za više od deset puta. Regulacija transpozicije događa se na razini transkripcije. Transkripcija se aktivira i uvođenjem mutiranog *ddm1* gena u biljku domaćina jer dovodi do smanjene DNA metilacije i smanjenog utišavanja gena (Hirochika i sur. 2000). Ključnu ulogu u indukciji transkripcije ovog elementa u stresnim situacijama imaju kratke ponavljajuće sekvence dužine 15 i 13 pb smještene uzvodno od TATA-boxa u 5'LTR-u i imaju ulogu *cis* regulatora (Takeda i sur. 1999). Motiv od 13 pb sadrži tzv. *H box* i *L box* sekvence koje su nađene u promotorima gena čija

ekspresija je tkivno-specifična ili ovisna o stresu. Na motiv se vežu transkripcijski faktori, članovi MYB proteinske porodice, koji imaju ulogu u obrani od UV zračenja i patogena (Sugimoto i sur. 2000). Osim u prirodnom domaćinu, duhanu, Tto1 može biti aktivan u drugim heterolognim biljkama kao što su uročnjak, *Arabidopsis thaliana* koja je dvosupnica i riža *Oryza sativa*, jednosupnica. (Hirochika i sur. 1996). Očito je da su faktori domaćina koji su bitni za transpoziciju visoko konzervirani što omogućuje upotrebu ovog elementa kao vektora za transfer gena. Zabilježena je i transformacija krumpira retrotranspozonom Tto1, međutim nije dokazana transpozicija u toj biljci (Ishizaki i Kato 2005). Retrotranspozon Tto1 se većinom ugrađuje u transkripcijski aktivne gene (Okamoto i Hirochika 2000) i zato ne iznenađuje da je regulacija transkripcije elementa Tto1 strogo kontrolirana (Bömhndorfer i sur. 2005).



Slika 1.7. Shematski prikaz retrotranspozona Tto1. 5'-LTR i 3'-LTR (*long terminal repeats*) predstavljaju duge ponavljajuće slijedove; PBS (*primer binding site*) mjesto vezanja tRNA početnice; PPT (*polypurine tract*) mjesto vezanja početnice (+) lanca; ORF (*open reading frame*) otvoreni okvir čitanja. Prikazane su kodirajuće regije unutar Gag i Pol ORF-a: gag-1 za strukturni protein; RB (*RNA-binding region*) regija za vezanje RNA; Pro proteaza; INT integraza; RT reverzna transkriptaza; RH Rnaza H (Takeda i sur. 2001).

1.3 Cilj istraživanja

Ovim istraživanjem željeli smo ispitati da li promijenjeni retrotranspozon Tto1 može završiti životni ciklus unutar stanica biljke *Arabidopsis thaliana*. Konkretno, da li retrotranspozon Tto1 može završiti životni ciklus ako u njega ugradimo gen biljeg PAT koji biljci daje rezistenciju na herbicid fosfinotricin (BASTA^R). Dokazivanjem novih kopija (cDNA) retrotranspozona Tto1 unatoč dodatku gena biljega, omogućilo bi umjesto PAT-a u retrotranspozon ugrađivanje gena biljke *A.thaliana* koje želimo (in)aktivirati. Naime, cDNA kao dvolančana molekula DNA mogla bi predstavljati potencijalni supstrat za homolognu rekombinaciju (HR). Istovremeno trebalo je spriječiti ugradnju novonastale cDNA retrotranspozona konvencionalnim putem (posredstvom integraze). Točkasta mutacija unutar integraze bi onemogućila ugradnju cDNA u nova mjesta u genomu i nakupljanje produkata reverzne transkripcije (cDNA) tj. akumulaciju supstrata za HR. Povećanjem koncentracije supstrata za HR i njegovim dužim prisustvom u sistemu, možda bi se mogla povećati učestalost HR-a u odnosu na ilegitemnu rekombinaciju.

2 MATERIJALI I METODE

2.1 Materijali

2.1.1 Bakterija *Escherichia coli*

Elektrokompetentni bakterijski soj *Escherichia coli* XL1-blue (Bullock i sur. 1987) korišten je za transformaciju elektroporacijom i umnažanje plazmidnih vektora.

2.1.2 Bakterija *Agrobacterium tumefaciens*

Elektrokompetentni soj bakterije *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 korišten je za transformaciju biljke *Arabidopsis thaliana* in planta metodom *floral dip*. Prijenos T-DNA iz plazmida pPZP221 osigurava pomoćni/binarni (*helper*) plazmid pMP90 (Koncz i Schell 1986).

2.1.3 Biljka *Arabidopsis thaliana*

U svim eksperimentima korišten je ekotip/primka Columbia (Col).

2.1.4 Plazmidi

U istraživanju su korišteni plazmidi pBcT, pBTtoi⁻, pBTtoi⁺, pBTtoiP', pUC18, pBluescript II KS⁺ i pPZP221. Plazmidi pBcT, pBTtoi⁻, pBTtoi⁺ i pBTtoiP' (Jelenić 1997) su derivati plazmida pBIB-HYG (Becker 1990). Plazmid pBIB-HYG je relativno veliki (11 kb) binarni vektor starije generacije s malim brojem kopija plazmida (*low-copy*) po stanici *E. coli* namijenjen za transformaciju biljaka pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Sadrži početak replikacije (*origin of replication, ori*) RK2 i gen za rezistenciju na kanamicin, što omogućuje selekciju bakterijskih transformanata, te T-DNA regiju, dio plazmida koji se

prenosi iz bakterije u biljnu stanicu i ugrađuje u genom. U T-DNA nalazi se gen za higromicin fosfotransferazu (*hpt*) koji je pod kontrolom promotora (Pn) gena za nopalinsintetazu (*nos*), a zadužen je za rezistenciju na higromicinom. Također, u T-DNA nalazi se i višestruko restrikcijsko mjesto (*multiple cloning site*, MCS) predviđeno za kloniranje fragmenata DNA kojima se želi transformirati biljna stanica.

2.1.4.1 Plazmidi pBTtoⁱ

Plazmid pBTtoⁱ⁺ ima promijenjenu kopiju retrotranspozona Tto1 ugrađenu u višestruko restrikcijsko mjesto u T-DNA. Transkripcija retrotranspozona je pod kontrolom konstitutivnog promotora 35S iz virusa mozaika cvjetače (*Cauliflower Mosaic Virus*, CaMV). Originalni promotor je odstranjen izrezivanjem fragmenta dužine 300 pb na početku 5'LTR-a kopije retrotranspozona Tto1. Terminator gena *nos* ugrađen je iza 3'LTR kraja za pospješene terminacije transkripcije. U restrikcijska mjesta *Sall* i *XbaI* ugrađen je fragment *Sall/XbaI* iz vektora p2RTi1 u kojemu je intron (int. II) dužine 94 pb u genu za integrazu (iza 2466. nukleotida). Intron potječe iz gena *rpII* za veliku podjedinicu RNA polimeraze II biljke *A. thaliana*.

U plazmid pBTtoⁱ⁻ ugrađen je fragment *Sall/XbaI* iz vektora p2RTi2 koji osim introna II ima i točkastu mutaciju u genu za integrazu. Nalazi se u 2463. nukleotidu aktivnog mjesta gena za integrazu retrotranspozona Tto1 gdje je kodon za aminokiselinu glutamat promijenjen u kodon za alanin (5'-GAG-3'→5'-GCG-3'). Ekspresijom ovako promijenjenog gena trebala bi nastati nefunkcionalna integraza.

Plazmid pBTto^{iP'} ima fragment *Sall/XbaI* poput onoga u pBTtoⁱ⁺ (s intronom II) i gen biljeg PAT koji biljci daje rezistenciju na herbicid fosfinotricin (BASTA^R). PAT je ugrađen u duplikaciju od 39 pb između PTT-a i 3'LTR-a koja obuhvaća završetak ORF-a (9 pb) retroelementa i početak LTR-a (30 pb). Pod kontrolom je promotora (Pn) i terminatora (pAn, poliadenilacijski slijed) za nopalinsintetazu ali u suprotnoj orijentaciji od smjera transkripcije gena retrotranspozona. Između promotora i gena PAT je drugi intron (int. I) dužine 85 pb koji također potječe iz gena *rpII* za veliku podjedinicu RNA polimeraze II biljke *A. thaliana*. (Jelenić 1997).

2.1.4.2 Plazmid pBcT

Plazmid pBcT dobiven je ugradnjom nepromijenjenog retrotranspozona Tto1 u višestruko restrikcijsko mjesto plazmida pBIB-HYG. Ne sadrži 3S5 promotor na 5' LTR kraju retrotranspozona ali ima terminator *nos* (pAn) na 3'LTR kraju (Bömdorfer i sur. 2005).

2.1.4.3 Plazmid pUC18

Vektor pUC18 (Fermentas) je mali plazmid prisutan u velikom broju kopija (*high-copy*) u bakteriji *E.coli*. Pogodan je za kloniranje, sekvenciranje DNA inserta te utvrđivanje transformanata koji sadrže fragment ugrađen u višestruko restrikcijsko mjesto na osnovi boje bakterijskih kolonija. Naime, sadrži dio gena *lacZ*, koji kodira α -lanac β -galaktozidaze, unutar kojega je višestruko restrikcijsko mjesto. Ako se ugradi insert, bakterije s takvim plazmidom neće dati plave kolonije na podlozi s X-galom (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktozid) IPTG-om (izopropil- β -D-tiogalaktozid). Vektor također sadrži gen *bla* za otpornost na ampicilin i početak replikacije *rep*.

2.1.4.4 Plazmid pBluescript II KS+

Plazmid (fagemid) pBluescript II KS+ (Fermentas) je derivat vektora pUC19. Osim dijela *lacZ* gena i višestrukog restrikcijskog mjesta unutar njega te gena za rezistenciju na ampicilin, sadrži i dva početka replikacije. Jedan je fl(+) iz filamentoznog faga a drugi je ColE1 iz plazmida pBR322.

2.1.4.5 Plazmid pPZP221

Plazmid pPZP221 je binarni vektor pogodan za transformaciju biljaka *A. thaliana*. Sadrži početak replikacije ColE1 iz plazmida pBR322 (za replikaciju u *E.coli*) i *ori* iz plazmida pVS1 (za replikaciju u *A.tumefaciens*). Također sadrži gen za aminoglikozid-3"-adenil transferazu (*aadA*) koja bakteriji daje svojstvo rezistencije na streptomycin i

spektinomicin. Unutar regije T-DNA, uz lijevi rub (*left border*, LB) nalazi se gen za gentamicin acetiltransferazu (*aacC1*) koja je odgovorna za rezistenciju na gentamicin, a uz desni rub (*right border*, RB) nalazi se gen *lacZ* za sintezu α -lanac β -galaktozidaze unutar kojeg je višestruko restrikcijsko mjesto. Gen za rezistenciju na gentamicin je pod kontrolom promotora 35S koji se nalazi između gena *aacC1* i *lacZ* (Hajdukiewicz i sur. 1994).

2.2 Metode

2.2.1 Kultiviranje biljke *Arabidopsis thaliana* u uvjetima *in vitro*

Za uspješnost većine eksperimenata potrebno je osigurati sterilnost biljnog materijala. To podrazumijeva oslobađanje biljaka od bakterija, kvasaca i gljivica. Sjemenke se steriliziraju 50 % (v/v) otopinom NaOCl uz dodatak deterdženta Triton X-100 u koncentraciji 0,1 % (v/v). U mikroepruvetu sa stotinjak sjemenki doda se 1 mL otopine i desetak minuta miješa na vibrirajućoj miješalici (vorteks). Nakon sterilizacije slijedi kratko centrifugiranje (*short spin*) i ispiranje u 1 mL sterilne dH_2O (deionizirana). Ispiranje se ponavlja tri puta nakon čega se sjemenke spremaju na 4°C preko noći kako bi se potaklo sinhronizirano klijanje.

Sjemenke se nasaduju na krutu podlogu PN(-S). Za sjemenke divljeg tipa, u podlogu se dodaje saharoza neposredno prije izlijevanja podloga (1% (w/v)), dok se za sjemenke transformiranih biljaka ista ne dodaje zbog opasnosti od kontaminacije bakterijama. U podlogu za selekciju transformanata, dodaje se antibiotik gentamicin (75 mg/L) ili herbicid BASTA (10 mg/L). Sjemenke se mogu resuspendirati u 2-3 mL 0,1%-tne agaroze radi bržeg nasadivanja. Hladni tretman za biljku *A. thaliana* je 2 dana a uzgoj na pločama traje 7 do 10 dana u fitotronu do razvoja prvih listova. Nakon toga mladi klijanci se presađuju na zemlju i drže u istim uvjetima. U fitotronu su uvjeti kratkog dana (8 h svjetlo, 25°C), a u biljnoj komori uvjeti dugog dana (16 h svjetlo, 25°C). Kako je uročnjak biljka dugog dana, biljke se prebacuju iz fitotrona u komoru kada se želi potaknuti cvjetanje.

Podloga PN(-S): za pripremu 2L podloge potrebno je prvo otopiti 0,0372 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ (50 μM) u 500 mL dH_2O , dodati 0,0278 g $\text{Fe(II)SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (50 μM) i nadopuniti s dH_2O do 1 L. Zatim se dodaje 20 mL matične otopine 100 x KNO_3 , 20 mL matične otopine 100 x MgSO_4 , 20 mL matične otopine 100 x $\text{Ca(NO}_3)_2$, 20 mL pufera 100 x KPO_4 i 2 mL 1000 x matične otopine mikroelemenata. pH se podesi na 5,5 pomoću 1 M KOH te doda dH_2O do 2 L. Otopini se prije autoklaviranja dodaje 20 g agara. Saharoza (1% (w/v)) se dodaje u podlogu nakon autoklaviranja, neposredno prije izlijevanja podloga.

Zemljani supstrat: u 60 L zemlje dodaje se 2 L H_2O , u kojoj je prethodno otopljeno 1,8 mL kulture *Bacillus* (300 $\mu\text{L}/10$ L supstrata) i 3 mL *Trichoderma* u prahu (0,5 mL/ 10 L

supstrata), te 3 g insekticida Dursbana (0,5 g/10 L supstrata) i perlita do 1/3 volumena supstrata.

2.2.2 Digestija restrikcijskim endonukleazama

Restrikcijske endonukleaze režu DNA sljedove na specifičnim mjestima. Zbog toga se upotrebljavaju za kloniranje i provjeru uspješnosti transformacije. Restrikcijski enzmi (Fermentas, New England Biolabs i Roche) koriste se prema uputama proizvođača u volumenu reakcijske smjese 20 μ L. Inkubacija se obično provodi sat vremena na 37°C no ovisi o enzimu i proizvođaču. Digestija s *DraI* (Fermentas) sadrži 0,5 μ L enzima u reakcijskoj smjesi i inkubacija traje sat vremena na 37°C, a s *BamHI* (Fermentas) 0,5 μ L enzima pod istim uvjetima. Digestija s *DdeI* (Roche) sadrži 0,3 μ L enzima u konačnom volumenu i provodi se tijekom noći na 37°C.

2.2.3 Elektroforeza u agaroznom gelu

Učinkovitost digestije i umnažanja DNA slijedova PCR-om provjerava se razdvajanjem fragmenata elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Gel se priprema otapanjem agaroze (Sigma) u puferu 1 x TAE s dodatkom etidij-bromida koncentracije 10 mg/mL ili boje Syber Safe koncentracije 10 mg/ μ L. Elektroforeza se provodi u puferu 1 x TAE na 100 V. Uzorci se pomiješaju s otopinom za unošenje u gel, 6 x LB (*loading buffer*). U posebnu jažicu stavlja se standard, 5 μ L λ /HindIII (50 ng/ μ L) ili 2 μ L O'GeneRuler™ DNA Ladder (0,1 μ g/ μ L). Veličina razdvojenih fragmenata određuje se usporedbom sa standardom. Fragmenti na gelu se analiziraju pomoću UV-transiluminatora (UVITEC).

Pufer 1 x TAE: 40 mM Tris baza, 20 mM acetat, 2 mM EDTA.

6 x LB: 40 % (v/v) glicerol, 0,25 % (w/v) bromfenolplavo, 0,25 % (w/v) ksilen cijanol.

2.2.4 Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela

Nakon razdvajanja fragmenata DNA pomoću elektroforeze, UV-transiluminatorom se gel vizualizira i skalpelom izreže željeni fragment. Za izolaciju iz gela koristi se protokol QIAEX II (Qiagen). Temelji se na vezanju molekula DNA na silicijske kuglice. Ovaj protokol je predviđen za izolaciju fragmenata DNA veličine od 40 pb do 50 kb iz agaroznih gelova u puferu TAE ili TBE. Komad gela sa željenim fragmentom ne smije biti teži od 250 mg. Ako je fragment veličine između 100 pb i 4 kb, u njega se dodaje tri puta više volumena pufera QX1 od volumena samog komadića gela. Silicijske kuglice QIAEX II se prije dodavanja promiješaju na tresilici 30 sekundi. U komad gela dodaje se 10 do 15 μL kuglica te inkubira deset minuta na 50°C kako bi se otopila agarozna, a DNA vezala na kuglice. Uz inkubaciju, suspenzija se miješa tresilicom svake dvije minute. Nakon inkubacije, suspenzija se centrifugira 30 sekundi na 13 000 rpm-a i zatim se ispire talog s 500 μL pufera QX1. Nakon resuspendiranja i ponovnog centrifugiranja, talog se ispire dva puta s 500 μL pufera PE. Slijedi sušenje taloga na zraku 10 do 15 minuta dok ne poprimi bijelu boju. Kako bi se DNA izolirala s kuglica, dodaje se 20 μL dH_2O , resuspendira vorteksiranjem te inkubira pet minuta na 50°C . Ponovo se centrifugira 30 sekundi pri 13 000 rpm-a te se supernatant preseli u novu mikroepruvetu i čuva na -20°C .

2.2.5 Ljepljenje/ligacija fragmenata DNA T4 DNA ligazom

Fragmenti DNA izolirani iz gela ugrađuju/ligiraju se u kružne molekule (plazmide) primjenom T4 DNA ligaze. Prvo se DNA poreže s 0,5 μL restrikcijskog enzima. U reakcijsku smjesu se doda 2 μL 10 x pufera za odgovarajuću restrikcijsku endonukleazu te dH_2O do konačnog volumena 20 μL . Nakon inkubacije sat vremena na 37°C , enzim se inaktivira 20 min. na 65 ili 85°C . Vektor se zatim tretira alkalnom fosfatazom iz škampa (*shrimp alkaline phosphatase* (SAP), Roche; 1 U/ μL). Alkalna fosfataza SAP katalizira defosforilaciju na 5' kraju. Vektor (linearna DNA) se defosforilira sat vremena na 37°C i nakon toga se inaktivira enzim 15 min. na 65°C . Takav vektor je spreman za ligaciju. Prije ligacije odrede se okvirne koncentracije DNA inserta i porezanog plazmida usporedbom sa DNA standardom nakon elektroforeze. U reakcijsku smjesu se stavlja 3 puta veća količina inserta u odnosu na vektor. Volumen vektora i inserta se određuje pomoću formule:

$$\text{vektor(ng)} \times \frac{\text{vel.inserta(kb)}}{\text{vel.vektora(kb)}} \times \left(\text{omjer} \frac{\text{insert}}{\text{vektor}} \right) = \text{insert(ng)}$$

Količina ukupne DNA po reakciji ne smije biti veća od 100 ng tj. 10 ng po 1 µL reakcijske smjese. Osim vektora i inserta dodaje se 0,5 µL T4 DNA ligaze (Fermentas), 1µL 10 x pufera za ligazu i dH₂O do konačnog volumena 10µL. Ligacija traje sat vremena na 22°C ili preko noći na 14-16°C.

2.2.6 Transformacija elektrokompetentnih stanica

Nakon kloniranja, plazmidna DNA se unosi u elektrokompetentne stanice bakterije *Escherichia coli*. Stanice se čuvaju na -80°C a prije same transformacije se drže pet minuta na ledu zajedno s kivetama (Biorad, 1 mm razmak između elektroda). Ako se kivete recikliraju, izlože se UV zračenju pet minuta prije nego se stave na led. Bakterijskoj suspenziji (50 µL) doda se 2 µL plazmidne DNA i sve se prebaci u kivetu za elektroporaciju te izloži strujnom pulsu od 1,80 kV trajanja ~3,90 ms uz pomoć elekroporatora (Biorad). Kivete se izvade i u njih se ulije 450 µl tekuće podloge 2 x TY te se sadržaj prebaci u mikroepruvetu i stavi inkubirati sat vremena na 37°C. Nakon toga slijedi nasađivanje bakterija na krutu podlogu 2 x TY s antibiotikom spektinomycinom (tablica 2.1) i nastavak inkubacije na 37°C preko noći.

Podloga 2 x TY: 1,6 % (w/v) tripton, 1 % (w/v) ekstrakt kvasca, 0,5 % (w/v) NaCl.

Transformacija elektrokompetentnih stanica bakterije *Agrobacterium tumefaciens* se odvija istim postupkom. Razlikuje se u volumenima, antibioticima i temperaturi inkubacije. Suspenziji agrobakterija volumena 100 µL dodaje se 0,2 µL plazmidne DNA, a inkubacija od sat vremena se odvija na sobnoj temperaturi (25°C) i kasnije na 28°C. Kruta podloga osim spektinomicina sadrži i antibiotike gentamicin i rifampicin.

Kivete se peru radi ponovnog korištenja. Najprije se isperu s dH₂O, pa s 0,25 M klorovodičnom kiselinom pola sata. Ponovo se isperu s dH₂O i poslije 96%-tnim etanolom pet minuta. Suše se u digestoru na sobnoj temperaturi.

Tablica 2.1. Antibiotici korišteni u pripravi podloga 2 x TY i LB

Antibiotik	Koncentracija matične otopine (mg/mL)	Koncentracija radne otopine (mg/L)
ampicilin	50	50
gentamicin	50	50
rifampicin	50	50
spektinomycin	50	50

2.2.7 Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *Escherichia coli*

Prvo se inokulira jedna kolonija bakterije *E. coli* s odgovarajućim plazmidom u 3 mL tekuće podloge 2 x TY sa spektinomycinom te se inkubira preko noći u tresilici na 250 rpm-a i 37°C. Osim podloge 2 x TY, može se koristiti i tekuća podloga LB. Bakterije se zatim istaloži centrifugiranjem jednu minutu na 13 000 rpm-a. Bakterijski talog se resuspendira u 200 µL pufera GTE i stavi na led. Potom se doda 400 µL otopine za lizu, lagano promiješa okretanjem mikroepruvete (4 puta) i stavi na led. Nakon pet minuta, doda se 300 µL otopine za neutralizaciju, okrene 4 puta i stavi na led deset minuta. Uzorak se centrifugira pet minuta na 13 000 rpm-a nakon čega se supernatant prebaci u novu mikroepruvetu i doda izopropanol volumena jednakog 0,7 volumena supernatanta te okrene 4 puta. Slijedi inkubacija deset minuta na -80°C i zatim centrifugiranje 15 minuta na 4°C pri 15 000 rpm-a. Supernatant se pažljivo izlije i doda se 0,5 mL 70%-tnog etanola. Nakon vorteksiranja, uzorak se centrifugira 5 minuta na 13 000 rpm-a. Supernatant se izlije, a talog suši u digestoru 10 do 15 minuta. Nakon sušenja, talog se otopi u 40 µL dH₂O i doda 2 µL RNaze A (10 µg/µL). Kako bi RNaza porezala preostalu RNA u uzorku, slijedi inkubacija od 30 min na 37°C. Plazmidna DNA se pohrani na -20°C.

Podloga LB: 1 % (w/v) tripton, 0,5 % (w/v) ekstrakt kvasca, 1 % (w/v) NaCl.

Pufer GTE: 50 mM glukoza, 10 mM EDTA pH 8, 25 mM Tris-HCl pH 8.

Otopina za lizu: 1 % (w/v) SDS, 0,2 M NaOH.

Otopina za neutralizaciju: 3 M NaAc pH 4,8.

2.2.8 Određivanje slijeda baza u molekuli DNA

Redoslijed baza u molekulama DNA (plazmidima) određivan je Sangerovom metodom (na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu ili slanjem u firmu Macrogen iz Koreje). Početnice za sekvenciranje su navedene u tablici 2.2. *Tto-LTRup-2* je početnica za regiju koja je uzvodno od 5'LTR-a, *M13 fw/rev* su standardne početnice za sekvenciranje fragmenata kloniranih u vektor pUC18, *Tto-LTR-up* za sekvence uzvodno od 3'LTR-a, *Tto-ORF-dn* za slijed nizvodno od PAT-a, *PATup* i *NOSp-PATdn* za područje PAT i intron nakon *nos* promotora

Tablica 2.2. Početnice korištene za određivanje redoslijeda baza u plazmidima i njihove temperature taljenja (T_m)

Početnica	T _m (°C)
<i>Tto-LTRup-2</i> : 5' TGA GAT AGG GAC CAA AAG TGC 3'	62,9
<i>M13 fw (-20) 17-mer</i> : 5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'	52,0
<i>M13 rev (-26) 17-mer</i> : 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'	50,0
<i>Tto-LTR-up</i> : 5' CTC TCC CAT ACA TCA CCA TAA TTG 3'	63,0
<i>Tto-ORF-dn</i> : 5' GAT GTG TTG GAG AAG AAG ATG TTG 3'	63,6
<i>PATup</i> : 5' GAC TTC AGC AGT GGG TGT AGA G 3'	62,8
<i>NOSp-PATdn</i> : 5' CTC GAG CTG CAG ATT ACT ATT TAC 3'	60,0

2.2.9 Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens*

Pojedinačne kolonije se inokulira u ~3 mL tekuće podloge 2 x TY s antibioticima (spektinomycin, rifampicin i gentamicin) te inkubira na 28°C u tresilici preko noći. Bakterije

se istalože centrifugiranjem jednu minutu na 13 000 rpm-a. Supernatant se izlije, a u talog doda 100 µL pufera TE i resuspendira. Doda se 5 µL proteinaze K (20 mg/mL), resuspendira i ostavi sat vremena na 37°C. Nakon centrifugiranja pet minuta na 13 000 rpm-a, supernatant se baci i u talog se stavi 200 µL pufera GTE, otopina resuspendira i stavi na led. Nakon toga se dodaje 400 µL otopine za lizu, uzorak se okreće 4 puta i stavi na led. Nakon pet minuta doda se 300 µL otopine za neutralizaciju, okreće 4 puta i drži na ledu deset minuta. Uzorak se centrifugira pet minuta na 13 000 rpm-a i prebaci supernatant u novu mikoepruvetu u kojoj je isti volumen fenol-kloroform-izoamilne (PCI) otopine (24:24:1). Slijedi vorteksiranje i centrifugiranje pet minuta na 13 000 rpm-a. Gornja, vodena faza se prebaci u novu mikoepruvetu s istim volumenom kloroform-izoamilne (CI) otopine (24:1) te se ponovi prethodni korak. Nakon centrifugiranja, gornja faza se prebaci u novu mikoepruvetu s izopropanolom čiji volumen je jednak 0,7 volumena vodene faze. Lagano se promiješa okretanjem te se inkubira preko noći na -20°C. Slijedi centrifugiranje od 15 minuta na +4°C pri 15 000 rpm-a. Izlije se supernatant a u talog doda 0,5 mL 70%-tnog etanola i promiješa na tresilici. Nakon centrifugiranja od pet minuta na 13 000 rpm-a, supernatant se baci a talog suši u digestoru 10-15 minuta. DNA se na kraju otopi u 30 µL dH₂O te uz dodatak 2 µL RNaze, inkubira 30 min. na 37°C i potom pohrani na -20°C.

Pufer TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.

2.2.10 Transformacija biljaka metodom „floral dip“

Metoda infiltracije bakterija *A.tumefaciens* vrlo je jednostavna i uspješna metoda transformacije vrste *A. thaliana* (Bechtold i sur. 1993). *Floral dip* se temelji na uranjanju biljaka u otopinu agrobakterija koje nose željeni plazmid (Clough i Bent 1998), pri čemu su za ovu vrstu transformacije najvažniji pravilan odabir biljaka obzirom na razvojni stadij cvjetova te priprema otopine agrobakterija. Primarno mjesto unosa T-DNA su kromosomi ženskog gametofita (Bechtold i sur. 2000; Desfeux i sur. 2000). Sam postupak temelji se na unosu gena u zigotu tijekom prve diobe ili u najranijim stadijima razvoja embrija. Nakon postupka transformacije biljke se uzgajaju u standardnim uvjetima do stvaranja zrelog sjemena čime su izbjegnute često zahtjevne i ograničavajuće tehnike kulture biljnog tkiva. Biljke *A. thaliana* se uzgoje do cvjetanja u uvjetima dugog dana. Tijekom uzgoja odreže se

glavni pup s ciljem poticanja većeg broja bočnih pupova. Biljke koje optimalno odgovaraju za ovaj postupak transformacije moraju imati veći broj nezrelih cvjetova i što manji broj komuški. Postavi se 600 mL prekonoćne kulture bakterija na podlozi LB s dodatkom gentamicina i spektinomicina za selekciju. Kultivira se preko noći na 28°C uz trešnju. U talog se, nakon centrifugiranja 15 min. na 4°C pri 3 000 rpm-a prekonoćne kulture, doda 300 mL infiltracijske podloge. Za uranjanje 2-3 male posude s biljkama potrebno je 100-200 mL otopine bakterija. Gornji dijelovi biljke se uranjaju u otopinu agrobakterija 15 minuta. Nakon toga vidljiv je tekući film koji ostaje na biljci. Biljke se pokriju najlonom radi održavanja vlažnosti i postave na podlogu horizontalno tako da nisu izložene direktnoj svjetlosti 16 do 24 sata. Daljnji uzgoj biljaka ide prema standardnom načinu uzgoja vrste *A. thaliana*. Zalijevanje biljaka prestaje u stadiju zrelog sjemena. Tada se sakuplja sjeme.

Infiltracijska podloga: za pripremu 300 mL podloge potrebno je otopiti 0,645 g soli po Murashige-Skooge-u, 15 g saharoze i 90 µL Silweta (surfaktant) u dH₂O. pH se podesi na 5,7 pomoću 1 M KOH te doda dH₂O do 300 mL.

2.2.11 Izolacija genomske DNA iz transgenih linija uročnjaka

Biljni listovi (100-150 mg) se homogeniziraju u tekućem dušiku pomoću tučka i tarionika ili u homogenizatoru. U tkivo se dodaje isti volumen prethodno ugrijanog pufera CTAB i inkubira 20 min na 65°C u termobloku. Nakon inkubacije doda se isti volumen otopine PCI te vorteksira i centrifugira dvije minute na 13 200 rpm-a. Gornji vodeni sloj se prebaci u novu mikroepruvetu i ponove prethodni ekstrakcijski koraci samo s otopinom CI. Zatim se u novi vodeni sloj doda 0,7 volumena izopropanola, promiješa okretanjem mikroepruvete nekoliko puta i inkubira na sobnoj temperaturi deset minuta. Slijedi centrifugiranje od 15 min. na 13 200 rpm-a. Supernatant se izlije, a talog se ispere s 0,5 mL ohlađenog 70%-tnog etanola i ponovo centrifugira pet minuta na 13 200 rpm-a. Nakon što se talog osuši, DNA se otopi u 50 µL dH₂O u kojoj je 2 µL RNaze. Genomska DNA se može čuvati na -20°C.

Pufer CTAB: 100 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2 % (w/v) CTAB (cetil-trimetil-amonij-bromid), 1 % (w/v) PVP (polivinilpirolidon).

2.2.12 Izolacija ukupne mRNA iz transgenih linija uročnjaka

Ova metoda se temelji na djelovanju Reagenta TRI (Sigma) koji se koristi u izolaciji svih vrsta molekula RNA iz različitih tkiva. Biljno tkivo (~100 mg) se prvo homogenizira u tekućem dušiku. Doda se 1 mL Reagenta TRI (volumen tkiva ne smije biti veći od 10 % ukupnog volumena reakcije) i inkubira pet minuta na sobnoj temperaturi. Na 1 mL Reagenta TRI doda se 0,2 mL kloroforma, promiješa 15 sekundi i ostavi 15 minuta na sobnoj temperaturi. Otopina se centrifugira 15 minuta na 4°C pri 13 500 rpm-a nakon čega se odvajaju tri faze: gornja vodena s RNA, srednja/interfaza s DNA i donja organska faza u kojoj su proteini. Gornji sloj se odvoji pipetom u novu mikroeprevetu i doda 0,5 mL izopropanola, a ostatak se pohranjuje na 4°C. Nakon inkubacije 10 minuta na sobnoj temperaturi, centrifugira se 10 minuta na 4°C pri 13 500 rpm-a. Talog se ispire s 1 mL 75%-tnog etanola. Promiješa se vorteksiranjem i centrifugira pet minuta na 4°C pri 9 000 rpm-a. Talog se suši 10 minuta u digestoru. Kad je potpuno suh doda se 50 µL depc. H₂O, promiješa pipetom i inkubira 10 minuta na 60°C. Na kraju se pohrani na -80°C.

Reagent TRI se može upotrijebiti i za izolaciju DNA iz biljnog tkiva. Nakon odvajanja faza centrifugiranjem otopine Reagenta TRI i homogeniziranog biljnog tkiva s kloroformom, gornja faza s RNA se potpuno odstrani. U ostatak se doda 0,3 mL 96%-tnog etanola, promiješa okretanjem mikroeprevete i ostavi na sobnoj temperaturi 2-3 minute. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 4°C pri 2 500 rpm-a, supernatant se odstrani. Talog se dva puta ispire s 1 mL otopine 10%-tnog etanola i 0,1 M Na-citrata. Svaki put se suspenzija inkubira pola sata na sobnoj temperaturi s povremenim miješanjem. Slijedi pet minuta centrifugiranja na 4°C pri 2 500 rpm-a. Talog se zatim resuspendira u 1,5-2 mL 75%-tnog etanola po mililitru Reagenta TRI i ostavi 10-20 minuta na sobnoj temperaturi. Centrifugiranje se ponovi a talog suši 10 minuta u digestoru. Osušeni talog se resuspendira pipetiranjem u 400 µL 8 mM NaOH. Centrifugira se 10 minuta na 13 500 rpm-a i odvoji supernatant u koji se doda 63,6 µL 0,1 M kiseline HEPES kako bi se postigao pH 7,5 i kako bi se otopina mogla koristiti za PCR.

2.2.13 Reverzna transkripcija i RT-PCR

Reverznom transkripcijom se ukupna stanična mRNA prepisuje u cDNA. Ukupna RNA se prvo tretira DNazom kako bi se uklonili mogući ostaci DNA u otopini. Ukupan volumen reakcijske smjese je 9 µL što uključuje: 5 µL RNA, 1 µL DNaze I (General Electric, 5 U/µL), 0,9 µL 10 x pufera i 2,1 µL dH₂O. Smjesa se inkubira 10 minuta na 37°C. Dodaje se 1 µL 25 mM EDTA tako da je konačan volumen 10 µL i inkubira se 10 minuta na 65°C. U reakcijsku smjesu se doda 1 µL 100 µM početnice oligo (dT)₁₈-a (Fermentas), inkubira pet minuta na 70°C pa stavi na led. U 1L µl smjese se doda 4 µL 5 x pufera, 2 µL 10 mM dNTP-a i 1 µL dH₂O tako da je konačan volumen 18 µL pa slijedi inkubacija pet minuta na 37°C. Doda se enzim reverzna transkriptaza (RevertAidTM M-MuLV RT, Fermentas; 20 U/µL) i inkubira sat vremena na 37°C. Enzim se inaktivira inkubacijom 10 minuta na 70°C nakon čega se stavlja na led pa spremi na -20°C. M-MuLV RT je RNA i DNA ovisna DNA polimeraza.

10 x pufer za DNazu: 40 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl₂, pH 7,5.

5 x pufer za reverznu transkriptazu: 250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT (ditiotreitol).

2.2.14 Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (*polymerase chain reaction*, PCR) je metoda korištena za analizu transgenih linija uročnjaka. Pomoću dviju vrsta početnica (*Tto-INRup* i *Tto-INRdn* te *Act3fw* i *Act3rev*) umnažale su se sekvence iz kalupa genomske DNA i reverzno prepisane cDNA.

Volumen reakcijske smjese je 20 µl i sadrži: 4 µl kalupa, 2 µl pufera (PCR Gold Buffer), 1,2 µl 25 mM MgCl₂, 2x2 µl 2 µM specifičnih početnica (tablica 2.3), 1 µl 2 mM smjese dNTP-a, 0,2 µl TAQ polimeraze (Roche) i 7,6 µl dH₂O. Program reakcije (tablica 2.4) počinje denaturacijom 10 minuta na 94°C, zatim slijedi ciklus od 30 ponavljanja koji obuhvaća: denaturaciju 30 s na 94°C, vezanje početnica na kalup 30 s na 60°C te produljivanje lanca DNA 1 min. na 72°C. Nakon ponavljanja, slijedi završno produljivanje

lanca 2 min. na 72°C. Program za RT-PCR se razlikuje samo u dužini trajanja elongacije lanca (30 s) i broju ponavljanja (35) ciklusa (tablica 2.5).

Tablica 2.3. Početnice korištene za lančanu reakciju polimerazom (PCR) i njihove temperature taljenja (T_m)

Početnica	T _m (°C)
<i>Tto-INRup</i> : 5' TTG CAG CCA AAT ACC CGT AA 3'	66,2
<i>Tto-INRdn</i> : 5' GTA TAC ACG CTG AAG ACC AAG GAT 3'	64,1
<i>Act3fw</i> : 5' GAT TTG GCA TCA CAC TTT CTA CAA TG 3'	66,2
<i>Act3rev</i> : 5' GTT CCA CCA CTG AGC ACA ATG 3'	65,6

Tablica 2.4. PCR program s početnicama *Tto-INR*

Korak	Temperatura i trajanje	
Predenaturacija	94°C, 10 min	
Denaturacija	94°C, 30 s	30 x
Prianjanje početnica	60°C, 30 s	
Elongacija/sinteza	72°C, 1 min	
Završna elongacija/sinteza	72°C, 2 min	

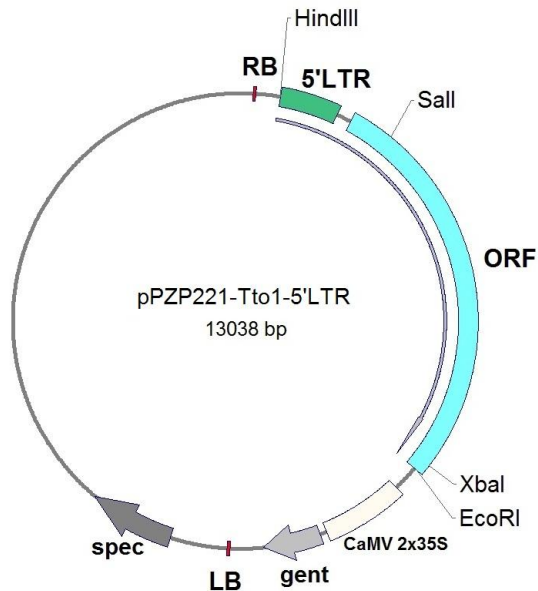
Tablica 2.5. Program za RT-PCR s početnicama *Act3*

Korak	Temperatura i trajanje	
Predenaturacija	94°C, 10 min	
Denaturacija	94°C, 30 s	35 x
Prianjanje početnica	60°C, 30 s	
Elongacija/sinteza	72°C, 30 s	
Završna elongacija/sinteza	72°C, 2 min	

3 REZULTATI

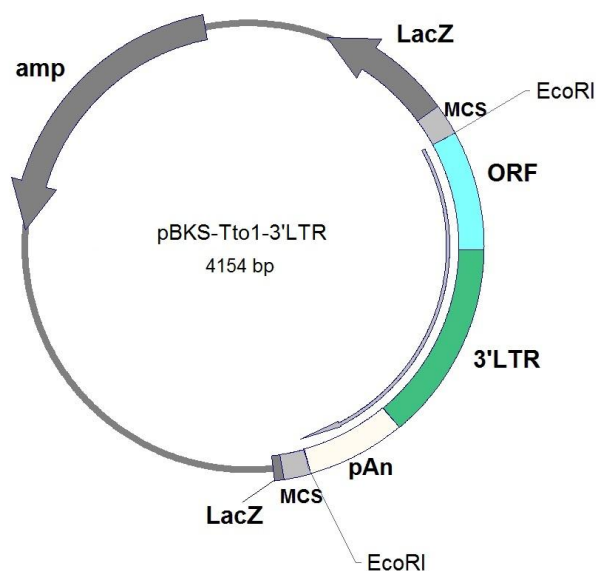
3.1 Binarni vektori

Konstruirano je pet vektora za transformaciju uročnjaka s retrotranspozonom Tto1. U svim priređenim konstruktima, fragmenti sa sekvencama retortranspozona Tto1 subklonirani su iz pBIB-HYG derivata (pBcT, pBTtoi⁻, pBTtoi⁺ i pBTtoiP') u višestruko restrikcijsko mjesto binarnog plazmida pPZP221 i to između restrikcijskih mjesta za endonukleaze *EcoRI* i *HindIII*. Samo je u jednom vektoru Tto1 nepromijenjen. Obzirom da potpune sekvence pBIB-HYG derivata nisu bile poznate, sekvenciranjem je utvrđeno da i ovaj vektor ima manjih modifikacija u Tto1. Naime, na 5'LTR kraju nedostaje prvih 31 pb, a na 3'LTR kraju zadnjih 6 pb. Obje spomenute delecije prisutne su u svih pet, u ovom radu konstruiranih, binarnih (biljnih ekspresijskih) vektora. Retrotranspozon Tto1 je subkloniran iz *low-copy* binarnog vektora pBcT u *high-copy* binarni vektor pPZP221. Najprije je fragment *HindIII/EcoRI* iz pBcT ugrađen u restrikcijska mjesta *HindIII* i *EcoRI* plazmida pPZP221 te je stvoren vektor pPZP221-Tto1-5'LTR (slika 3.1).

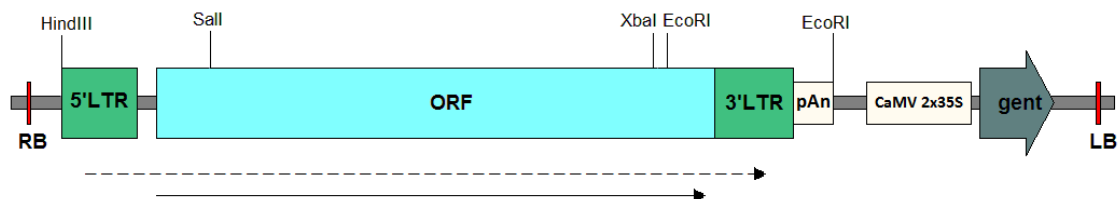


Slika 3.1. Shematski prikaz plazmida pPZP221-Tto1-5'LTR. RB (*right border*) i LB (*left border*) označavaju desni i lijevi rub T-DNA regije unutar vektora pPZP221. 5'LTR je dugi ponavljajući slijed, a ORF dio otvorenog okvira čitanja retrotranspozona Tto1. CaMV 2x35S je duplikacija promotora 35S iz virusa mozaika cvjetače. Gent predstavlja gen za rezistenciju na gentamicin, a Spec gen za rezistenciju na spektinomycin. Označena su mjesta koja prepoznaju restrikcijske endonukleaze *HindIII*, *Sall*, *XbaI* i *EcoRI*.

Zatim je manji fragment *EcoRI/EcoRI* iz pBcT ugrađen u mjesto *EcoRI* u pBluescript II KS+ kako bi se fragment prije subkloniranja mogao umnožiti u velikom broju kopija. Dobiveni vektor nazvan je pBKS-Tto1-3'LTR (slika 3.2).



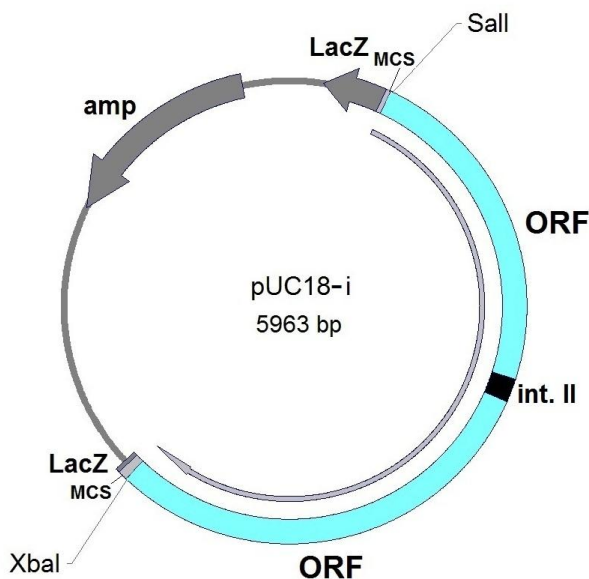
Slika 3.2. Shematski prikaz plazmida pBKS-Tto1-3'LTR. ORF prikazuje dio otvorenog okvira čitanja, 3'LTR dugi ponavljajući slijed retrotranspozona Tto1; pAn terminator gena *nos*. MCS (*multiple cloning site*) predstavlja višestruko restrikcijsko mjesto plazmida; *LacZ* gen za α-lanac β-galaktozidaze; *Amp* gen za rezistenciju na ampicilin. Označena su mjesta koja prepoznaje restrikcijska endonukleaza *EcoRI*.



Slika 3.3. Shematski prikaz regije T-DNA vektora pPZP221-Tto1. Regije RB i LB označavaju desni i lijevi rub T-DNA regije unutar vektora pPZP221. 5'LTR i 3'LTR su dugi ponavljajući slijedovi, a ORF otvoren okvir čitanja retrotranspozona Tto1. pAn predstavlja terminator gena *nos*. CaMV 2x35S je duplikacija promotora 35S iz virusa mozaika cvjetače. *Gent* predstavlja gen za rezistenciju na gentamicin. Označena su mjesta koja prepoznaju restrikcijske endonukleaze *HindIII*, *SalI*, *XbaI* i *EcoRI*. Isprekidana strelica označava smjer početka i kraja transkripcije a puna strelica smjer početka i kraja translacije.

Ugradnjom fragmenta *EcoRI/EcoRI* iz pBluescript II KS+ u restrikcijsko mjesto *EcoRI* plazmida pPZP221-Tto1-5'LTR dobiven je vektor koji je nazvan pPZP221-Tto1 (slika 3.3) i

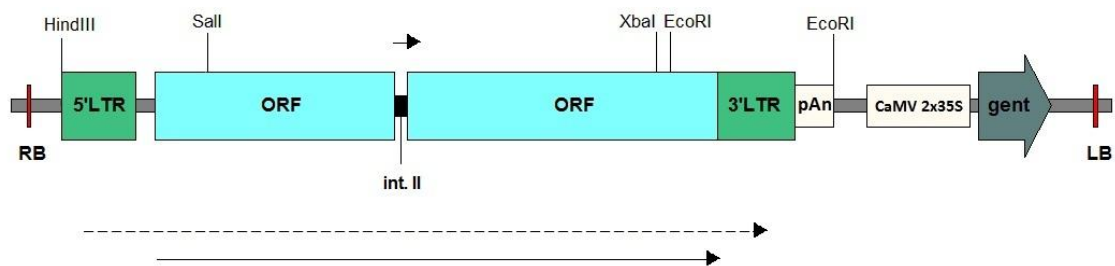
služio je za ispitivanje ekspresije Tto1 u transformantima *A.thaliana*. U svim ostalim vektorima u genu za integrazu unutar ORF-a ugrađen je intron II (int. II) dužine 94 pb (iza 2466. nukleotida Tto1 retrotranspozona). Intron II potječe iz gena *rpII* (od 3372. do 3465. nukleotida) za veliku podjedinicu RNA polimeraze II biljke *A. thaliana*. Intron II unutar fragmenta *Sall/XbaI* iz vektora pBTto1⁺ je najprije subkloniran u mjesta *Sall* i *XbaI* plazmida pUC18 kako bi se mogao umnožiti u velikom broju kopija. Dobiveni vektor nazvan je pUC18-i (slika 3.4).



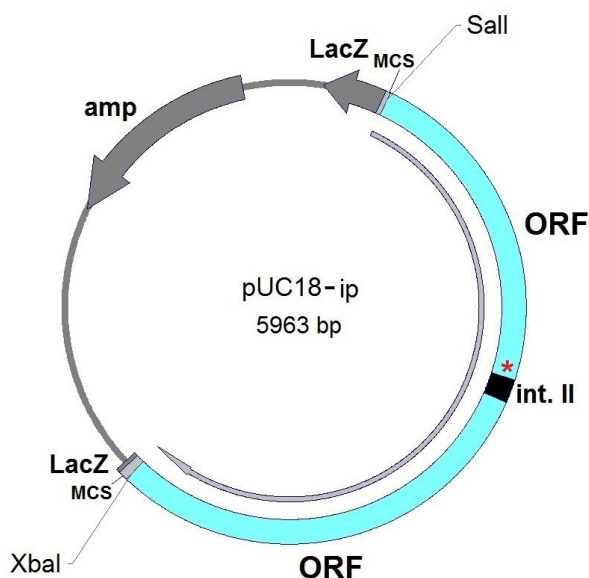
Slika 3.4. Shematski prikaz plazmida pUC18-i. ORF predstavlja dio otvorenog okvira čitanja retrotranspozona Tto1; int. II intron u genu za integrazu; MCS višestruko restrikcijsko mjesto; *LacZ* gen za α -lanac β -galaktozidaze; *Amp* gen za rezistenciju na ampicilin. Označena su mjesta koja prepoznaju restrikcijske endonukleaze *Sall* i *XbaI*.

Fragment *Sall/XbaI* iz vektora pUC18-i je nakon toga ugrađen u plazmid pPZ221-Tto1 porezan sa enzimima *Sall* i *XbaI*. Dobiveni vektor je nazvan pPZP221-Tto1-i (slika 3.5) jer se od vektora pPZP221-Tto1 razlikuje samo u tome što sadrži intron II u genu za integrazu. On je omogućio praćenje novih kopija u genomu, na način da se pomoću početnica *Tto-INRup* i *Tto-INdn*, koje omeđuju intron (94 pb), mogla razlikovati izvorna kopija Tto1 na T-DNA od novih kopija koje su tijekom transkripcije izgubile intron.

Fragment *Sall/XbaI* (s intr. II i točkastom mutacijom) iz vektora pBTto1⁻ također je ugrađen u mjesta *Sall* i *XbaI* u pUC18 te je stvoren vektor pUC18-ip (slika 3.6).



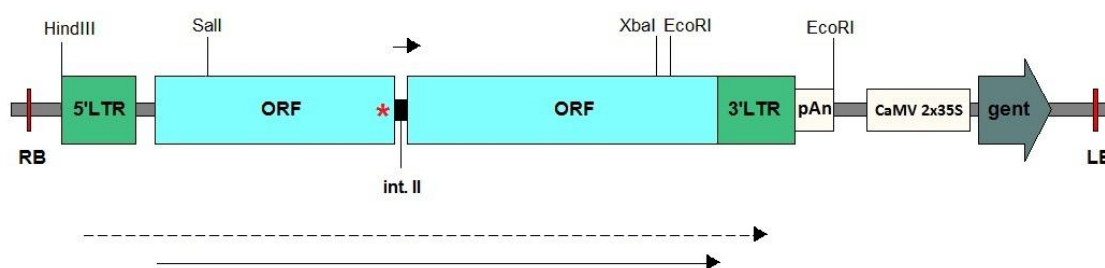
Slika 3.5. Shematski prikaz regije T-DNA vektora pPZP221-Tto1-i. Regije RB i LB označavaju desni i lijevi rub T-DNA regije unutar vektora pPZP221. 5'LTR i 3'LTR su dugi ponavljajući slijedovi, a ORF otvoren okvir čitanja retrotranspozona Tto1. pAn predstavlja terminator gena *nos*. Intron (int.) II se nalazi unutar ORF-a, u genu za integrazu. CaMV 2x35S je duplikacija promotora 35S iz virusa mozaika cvjetače. *Gent* predstavlja gen za rezistenciju na gentamicin. Označena su mjesta koja prepoznaju restriksijske endonukleaze *HindIII*, *SalI*, *XbaI* i *EcoRI*. Isprekidana strelica označava smjer te početak i kraj transkripcije a puna strelica smjer te početak i kraj translacije.



Slika 3.6. Shematski prikaz plazmida pUC18-ip. ORF predstavlja dio otvorenog okvira čitanja retrotranspozona Tto1; int. II intron u genu za integrazu; MCS višestruko restriksijsko mjesto; *LacZ* gen za α -lanac β -galaktozidaze; *Amp* gen za rezistenciju na ampicilin. Označena su mjesta koja prepoznaju restriksijske endonukleaze *SalI* i *XbaI*. Zvezdica (*) označava točkastu mutaciju u genu za integrazu.

Ugradnjom fragmenta *SalI/XbaI* s intronom i točkastom mutacijom iz plazmida pUC18-ip u restriksijska mjesta *SalI* i *XbaI* plazmida pPZP221-Tto1, nastaje vektor nazvan pPZP221-Tto1-ip (slika 3.7). Ovaj vektor osim introna II ima i točkastu mutaciju u genu za

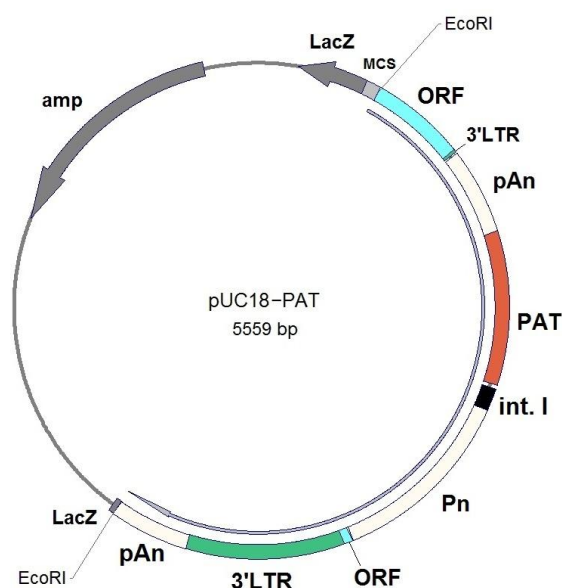
integrazu. Točkasta mutacija nalazi se u katalitičkom mjestu integraze: GAG (Gln) → GCG (Ala). Ova točkasta mutacija uzrokuje inaktivaciju integraze i trebala bi onemogućiti ugradnju cDNA u nova mjesta u genomu te posljedično uzrokovati njezino nakupljanje tj. akumulaciju supstrata za HR. Naime, utvrđeno je da u genomu *A.thaliana* ne postoje retroelementi koji bi mogli osigurati funkcionalnu integrazu za završetak životnog ciklusa ove modificirane varijante Tto1.



Slika 3.7. Shematski prikaz regije T-DNA vektora pPZP221-Tto1-ip. Regije RB i LB označavaju desni i lijevi rub T-DNA regije unutar vektora pPZP221. 5'LTR i 3'LTR su dugi ponavljajući slijedovi, a ORF otvoren okvir čitanja retrotranspozona Tto1. pAn predstavlja terminator gena *nos*. Intron (int.) II se nalazi unutar ORF-a, u genu za integrazu. CaMV 2x35S je duplikacija promotora 35S iz virusa mozaika cvjetače. *Gent* predstavlja gen za rezistenciju na gentamicin. Označena su mjesta koja prepoznaju restrikcijske endonukleaze *HindIII*, *Sall*, *XbaI* i *EcoRI*. Zvezdica (*) označava točkastu mutaciju u genu za integrazu. Isprekidana strelica označava smjer te početak i kraj transkripcije a puna strelica smjer te početak i kraj translacije.

Sljedeća dva vektora, osim introna u integrazi, imaju gen biljeg PAT (fosfinotricin acetiltransferazu) koja biljci daje rezistenciju na herbicid fosfinotricin (BASTA^R). PAT je ugrađen u duplikaciju od 39 pb između PTT-a i 3' LTR-a i pod kontrolom je promotora (Pn) i terminatora (pAn) za nopaln sintetazu u suprotnoj orijentaciji od smjera transkripcije ORF-a retrotranspozona Tto1. Funkcija navedene duplikacije je omogućavanje normalne transkripcije Tto1, koja završava pri kraju 3'LTR-a, i normalne translacije, koja završava stop kodonom u dupliciranom 9 pb fragmentu (slika 3.10 i 3.12, puna strelica). Između gena PAT i njegovog promotora ugrađen je drugi intron (int. I) dužine 85 pb koji također potječe iz gena *rpII* (od 4188. do 4272. pb). Za ekspresiju gena biljega potrebno je izrezivanje introna koji se ne može ukloniti ukoliko transkripcija odmah počne s promotora Pn. Prvo je potrebna transkripcija s 5'LTR-a kako bi se uklonio intron, a tek nakon ugradnje cDNA u novi lokus moguća je uspješna transkripcija s promotora Pn i ekspresija rezistencije na herbicid. Fragment PAT koji sadrži gen PAT, promotor i terminator *nos*, intron I i 3'LTR

retrotranspozona, dobiven je iz plazmida pBTtoiP' i prvo je ugrađen u restrikcijsko mjesto *EcoRI* plazmida pUC18 kako bi dobili vektor pUC18-PAT (slika 3.8).



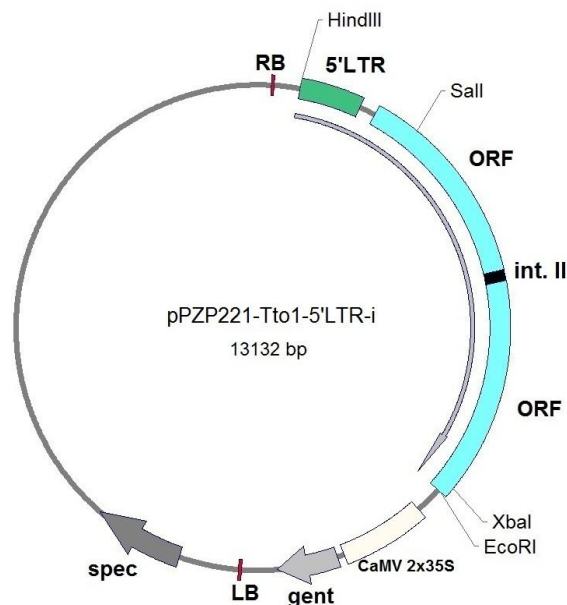
Slika 3.8. Shematski prikaz plazmida pUC18-PAT. ORF predstavlja dio otvorenog okvira čitanja; 3'LTR dugi ponavljajući slijed retrotranspozona Tto1; pAn terminator *nos*; PAT gen za rezistenciju na herbicid BASTA; Pn promotor *nos*. Između ORF-a i terminatora pAn nalazi se duplikacija 3'LTR-a od 9 pb. Intron (int.) I se nalazi između gena PAT i promotora Pn. Između Pn i 3'LTR je duplikacija ORF-a od 31 pb; MCS je višestruko restrikcijsko mjesto; *LacZ* gen za α -lanac β -galaktozidaze; *Amp* gen za rezistenciju na ampicilin. Označena su mjesta koja prepoznaje restrikcijska endonukleaza *EcoRI*.

Zatim je u pPZP221-Tto1-5'LTR (slika 3.9) ugrađen fragment *Sall/XbaI* s intronom II iz pUC18-i (slika 3.4). U ovakav vektor je ugrađen fragment PAT iz vektora pUC18-PAT te je dobiveni vektor nazvan pPZP221-Tto1-iPAT (slika 3.10). On je poslužio za praćenje životnog ciklusa Tto1 putem ekspresije rezistencije na herbicid BASTA.

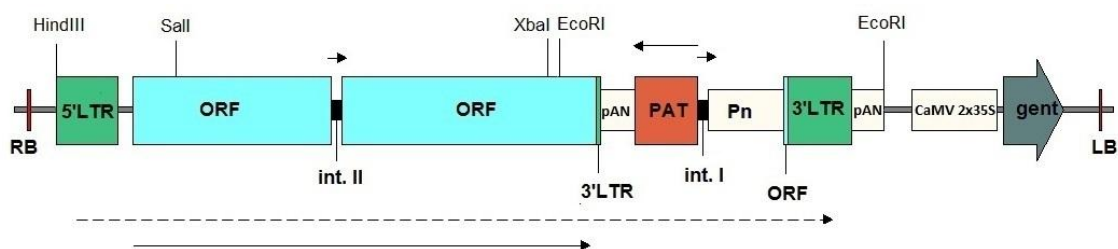
Peti konstrukt osim introna II i fragmenta PAT, sadrži i točkastu mutaciju u genu za integrazu. Zbog toga je bilo potrebno fragment *Sall/XbaI* (s intronom i točkastom mutacijom) iz pUC18-ip (slika 3.6) ugraditi u mjesta *Sall* i *XbaI* u pPZP221-Tto1-5'LTR. Dobiveni konstrukt (slika 3.11) nazvan je pPZP221-Tto1-5'LTR-i, poslužio je kao vektor za ugradnju fragmenta PAT iz plazmida pUC18-PAT.

Ugradnjom fragmenta PAT u restrikcijsko mjesto *EcoRI* dobiven je vektor koji je nazvan pPZP221-Tto1-ipPAT (slika 3.12). Biljke s petim vektorom ne bi trebale ispoljavati

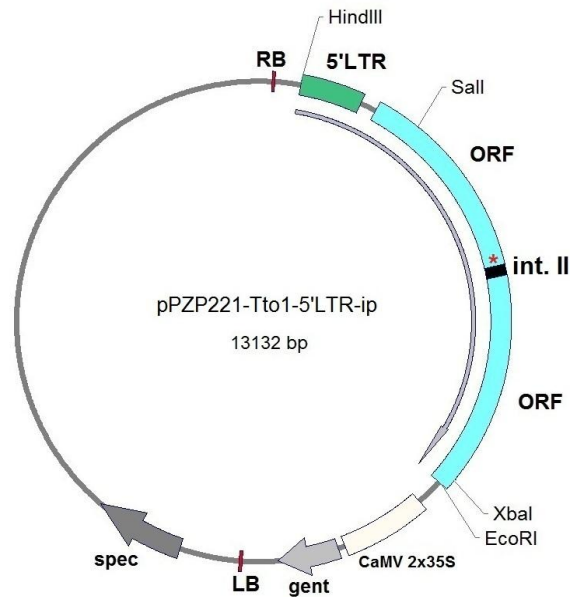
rezistenciju budući da se cDNA tj. nove kopije retrotranspozona, zbog točkaste mutacije, ne mogu ugraditi u genom.



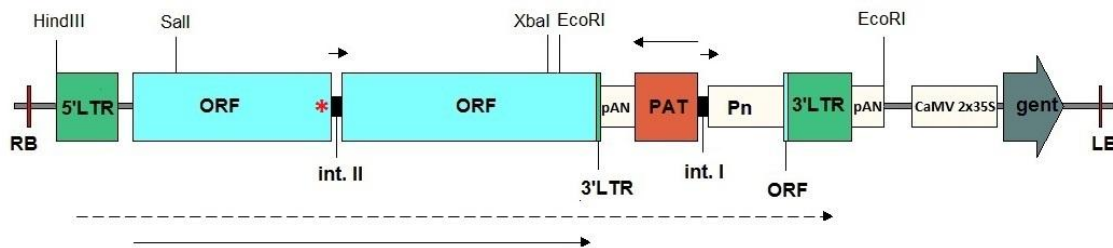
Slika 3.9. Shematski prikaz plazmida pPZP221-Tto1-5'LTR-i. Regije RB i LB označavaju desni i lijevi rub T-DNA regije unutar vektora pPZP221. 5'LTR je dugi ponavljajući slijed, a ORF dio otvorenog okvira čitanja retrotranspozona Tto1. Intron (int.) II se nalazi unutar ORF-a, u genu za integrazu. CaMV 2x35S je duplikacija promotora 35S virusa mozaika cvjetače. Gent predstavlja gen za rezistenciju na gentamicin, a Spec gen za rezistenciju na spektinomycin. Označena su mjesta koja prepoznaju restriksijske endonukleaze *HindIII*, *Sall*, *XbaI* i *EcoRI*.



Slika 3.10. Shematski prikaz regije T-DNA vektora pPZP221-Tto1-iPAT. Regije RB i LB označavaju desni i lijevi rub T-DNA regije unutar vektora pPZP221. 5'LTR i 3'LTR su dugi ponavljajući slijedovi, a ORF otvoren okvir čitanja retrotranspozona Tto1. Intron (int.) II se nalazi unutar ORF-a, u genu za integrazu. pAn predstavlja *nos* terminator; PAT gen za rezistenciju na herbicid BASTA; Pn *nos* promotor. Između ORF-a i terminatora pAn nalazi se duplikacija 3'LTR-a od 9 pb. Intron int. I se nalazi između gena PAT i promotora Pn. Između Pn i 3'LTR je duplikacija ORF-a od 31 pb. CaMV 2x35S je duplikacija promotora 35S iz virusa mozaika cvjetače. Gent predstavlja gen za rezistenciju na gentamicin. Označena su mjesta koja prepoznaju restriksijske endonukleaze *HindIII*, *Sall*, *XbaI* i *EcoRI*. Isprekidana strelica označava smjer te početak i kraj transkripcije a puna strelica smjer te početak i kraj translacije.



Slika 3.11. Shematski prikaz plazmida pPZP221-Tto1-5'LTR-ip. Regije RB i LB označavaju desni i lijevi rub T-DNA regije unutar vektora pPZP221. 5'LTR je dugi ponavljajući slijed, a ORF dio otvorenog okvira čitanja retrotranspozona Tto1. Intron (int.) II se nalazi unutar ORF-a, u genu za integrazu. CaMV 2x35S je duplikacija promotora 35S virusa mozaika cvjetače. *Gent* predstavlja gen za rezistenciju na gentamicin, a *Spec* gen za rezistenciju na spektinomycin. Označena su mjesta koja prepoznaju restrikcijske endonukleaze *HindIII*, *Sall*, *XbaI* i *EcoRI*. Zvezdica (*) predstavlja točkastu mutaciju unutar gena za integrazu.



Slika 3.12. Shematski prikaz regije T-DNA vektora pPZP221-Tto1-ipPAT. Regije RB i LB označavaju desni i lijevi rub T-DNA regije unutar vektora pPZP221. 5'LTR i 3'LTR su dugi ponavljajući slijedovi, a ORF otvoren okvir čitanja retrotranspozona Tto1. Intron (int.) II se nalazi unutar ORF-a, u genu za integrazu. pAn predstavlja *nos* terminator; PAT gen za rezistenciju na herbicid BASTA; Pn *nos* promotor. Između ORF-a i terminatora pAn nalazi se duplikacija 3'LTR-a od 9 pb. Intron (int.) I se nalazi između gena PAT i promotora Pn. Između Pn i 3'LTR je duplikacija ORF-a od 31 pb. CaMV 2x35S je duplikacija promotora 35S virusa mozaika cvjetače. *Gent* predstavlja gen za rezistenciju na gentamicin. Označena su mjesta koja prepoznaju restrikcijske endonukleaze *HindIII*, *Sall*, *XbaI* i *EcoRI*. Zvezdica (*) predstavlja točkastu mutaciju unutar gena za integrazu. Isprekidana strelica označava smjer te početak i kraj transkripcije a puna strelica smjer te početak i kraj translacije.

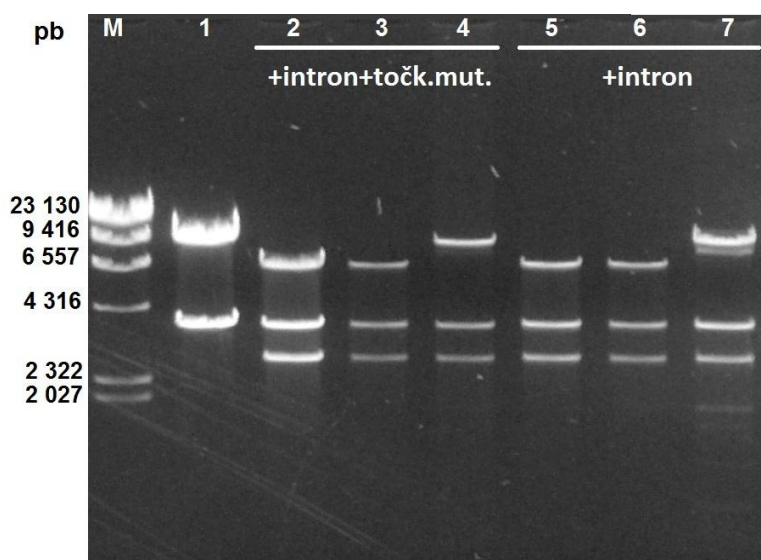
3.2 Transformacija bakterije *A. tumefaciens*

Vektori su nakon kloniranja ubačeni u elektrokompetentni soj *E.coli*. Plazmidna DNA je umnožena u bakteriji *E.coli* nakon čega je izolirana iz tekuće prekonoćne kulture i unesena elektroporatorom u elektrokompetentan soj bakterije *A. tumefaciens* radi transformacije uročnjaka. Prije transformacije biljaka izolirana je plazmidna DNA iz bakterija i digerirana restriksijskim endonukleazama *DraI*, *BamHI* i *DdeI* radi konačne provjere plazmidnih konstrukata.

Intron II ima restriksijsko mjesto za *DraI* što je ovaj enzim učinilo pogodnim za kontrolnu digestiju. Digestijom su provjereni plazmidi izolirani iz bakterije *E.coli*. Porezani su vektori pPZP221-Tto1-iPAT i pPZP221-Tto1-ipPAT. Kontrole su bile vektori bez introna i/ili fragmenta PAT. Endonukleaza *DraI* reže pPZP221-Tto1-iPAT i pPZP221-Tto1-ipPAT na četiri mjesta pa su očekivani fragmenti veličine: 9 642, 3 612, 2 676 i 77 pb. Enzim reže pPZP221-Tto1-5'LTR na 3 fragmenta veličine: 9 351, 3 610 i 77 pb. Plazmidi pPZP221-Tto1-5'LTR-i i pPZP221-Tto1-5'LTR-ip imaju 4 restriksijska mjesta i daje fragmente veličine: 6 769, 3 610, 2 676 i 77 pb (tablica 3.1.). Elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu su razdvojeni fragmenti nastali digestijom (slika 3.13).

Tablica 3.1. Očekivani fragmenti nakon digestije s restriksijskom endonukleazom *DraI*.

Broj uzorka	1	2 i 3	4	5 i 6	7
Plazmid	pPZP221-Tto1-5'LTR	pPZP221-Tto1-5'LTR-ip	pPZP221-Tto1-ipPAT	pPZP221-Tto1-5'LTR-i	pPZP221-Tto1-iPAT
Fragmenti nakon digestije s <i>DraI</i> (pb)	9 351 3 610 77	6 769 3 610 2 676 77	9 642 3 612 2 676 77	6 769 3 610 2 676 77	9 642 3 612 2 676 77

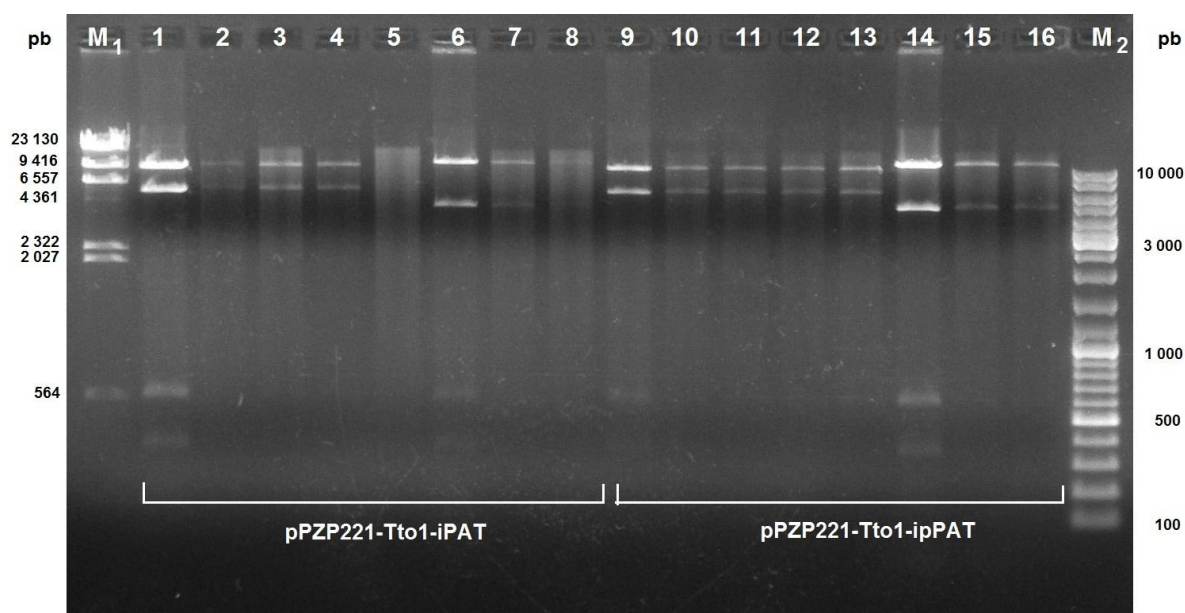


Slika 3.13. Elektroforetsko razdvajanje produkata digestije plazmida iz bakterije *E.coli* s restrikcijom endonukleazom *DraI*. Brojevi kojima su označeni uzorci u jažicama odnose se na podatke u tablici 3.1. Korišteni standard (M): λ *HindIII*.

Unutar fragmenta PAT postoje tri restriksijska mjesta *BamHI*. Kako u vektorima pPZP221-Tto1-iPAT i pPZP221-Tto1-ipPAT postoji još jedno mjesto *BamHI* iza 5'LTR kraja retrotranspozona, digestija s ovim enzimom bi trebala dati četiri fragmenta veličine: 10 873, 4 226, 571 i 337 (tablica 3.2). No, ako je fragment PAT ugrađen u suprotnoj orijentaciji (*antisense*) obzirom da je omeđen s dva mjesta *EcoRI*, digestija s *BamHI* rezultira isto s četiri fragmenta ali različitih veličina (9 530, 5 569, 571 i 337 pb). Digestija s *BamHI* bila je kontrola za dobru orijentaciju (*sense*) fragmenta PAT unutar vektora. Kontrole su bile plazmidi iz bakterije *E.coli* poznatih orijentacija. Dobiveni su fragmenti (slika 3.14) koji odgovaraju očekivanima s tim da su plazmidi s *antisense* regijom PAT imali drugačiji obrazac veličina što se može vidjeti po drugom fragmentu (5 569 pb) koji je veći od onog u *sense* orijentaciji (4 226 pb).

Tablica 3.2. Očekivani fragmenti nakon digestije vektora pPZP221-Tto1-i(p)PAT s restrikcijom endonukleazom *BamHI*.

Orijentacija PAT fragmenta	<i>sense</i>	<i>antisense</i>
Fragmenti nakon digestije s <i>BamHI</i> (pb)	10 873 4 226 571 337	9 530 5 569 571 337



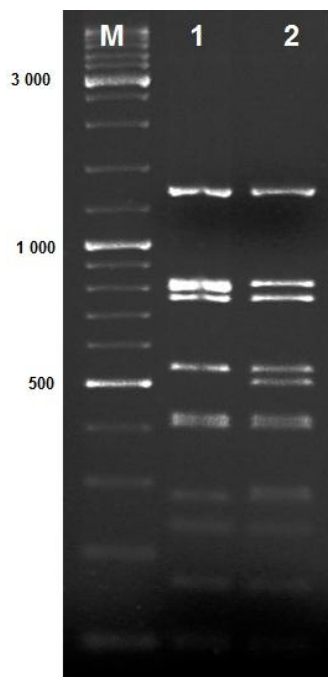
Slika 3.14. Elektroforetsko razdvajanje produkata digestije plazmida iz bakterija *E.coli* (1, 6, 9, 14) i *A. tumefaciens* (ostali uzorci) s restriksijskom endonukleazom *Bam*HI. Korišteni standardi M₁: λ /HindIII; M₂: DNA ljestve 100-10 000 pb.

Na slici 3.14 može se uočiti da je fragment PAT u uzorcima 6-8 i 14-16 u *sense* orijentaciji dok je u ostalima *antisense*.

Digestija s restriksijskom endonukleazom *Dde*I korištena je kao kontrola za prisutnost točkaste mutacije u genu za integrazu. Naime, točkasta mutacija je ugrađena u mjesto koje prepoznaje *Dde*I tako da se mutacijom gubi jedno restriksijsko mjesto *Dde*I. Enzimom su porezani vektori pUC18-i i pUC18-ip. Vektor s intronom ima 13 mjesta *Dde*I i trebao bi dati 13 fragmenata dok vektor s intronom i točkastom mutacijom ima 12 mjesta i daje isto toliko fragmenata. U tablici 3.3 su navedeni fragmenti nastali digestijom s *Dde*I za razlikovanje konstrukata sa i bez mutacije. Elektroforezom su razdvojeni fragmenti i moglo se jasno razlikovati vektore sa i bez točkaste mutacije u genu za integrazu (slika 3.15). Prva dva najveća fragmenta nastala digestijama ista su u oba vektora (1 319 i 822 pb) no razlikuju se već u veličinama trećeg fragmenta. Vektor pUC18-ip daje veći fragment (804 pb) od pUC18-i (760 pb).

Tablica 3.3. Očekivani fragmenti nakon digestije s restriksijskom endonukleazom *DdeI*.

Plazmid	pUC18-ip	pUC18-i
Fragmenti nakon digestije s <i>DdeI</i> (pb)	1319	1319
	822	822
	804	760
	760	540
	540	511
	426	426
	409	409
	281	293
	235	281
	166	235
	104	166
	97	104
		97



Slika 3.15. Elektroforetsko razdvajanje produkata digestije plazmida iz bakterije *E.coli* s restriksijskom endonukleazom *DdeI*. Brojevi kojima su označeni uzorci u jažicama odnose se na podatke u tablici 3.3. Korišteni standard (M): DNA ljestve 100-10 000 pb.

3.3 Transformacija biljaka *A.thaliana*

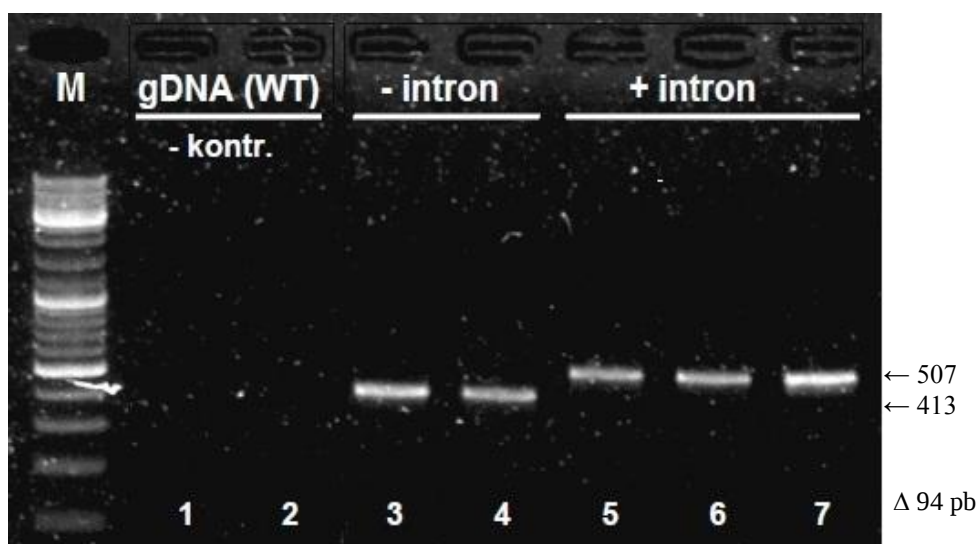
Nakon selekcije ciljanih klonova, agrobakterijama su transformirane biljke *A.thaliana*. Biljke (generacija T₀) su se nastavile razvijati u standardnim uvjetima. Nakon što su dale zrele sjemenke, iste su nasadene na podlogu PN(-S) s gentamicinom kao kontrola za uspješnu transformaciju tj. ugradnju T-DNA u genom biljke. Preživjeli su transformanti (generacija T₁) koji su imali ugrađen gen za rezistenciju na gentamicin (slika 3.16). Pokazalo se da je transformacija bila uspješna za sve konstrukte te je selekcija na gentamicinu bila dovoljno dobra za izolaciju transformanata.



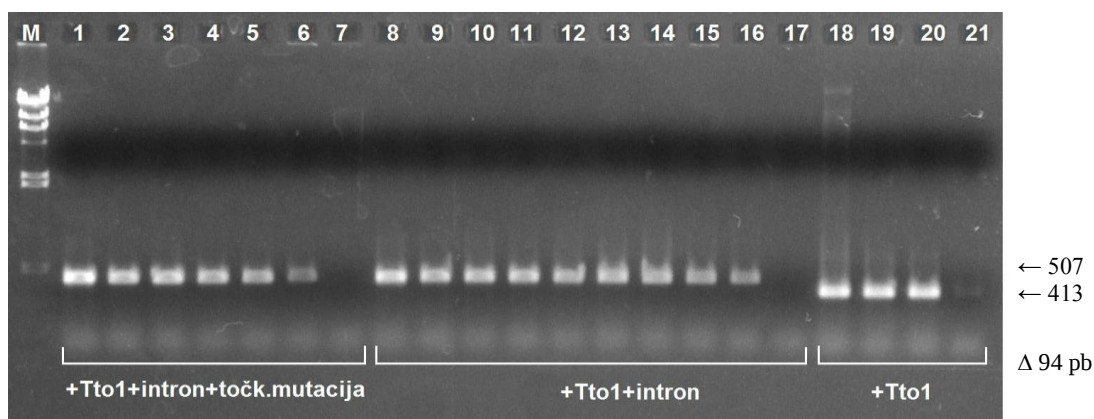
Slika 3.16. Transformanti uročnjaka generacije T₁ na podlozi PN(-S) s gentamicinom.

3.4 Analiza transgena u linijama transformiranog uročnjaka

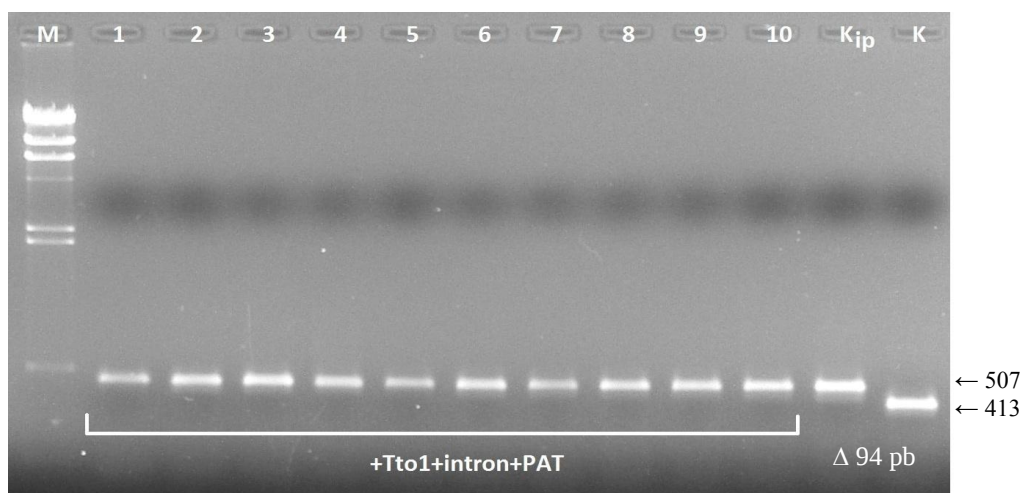
Genomska DNA izolirana je iz mladih listova transformanata T_1 generacije selektiranih na gentamicinu i korištena je kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom (PCR). Početnice za ovu reakciju bile su *Tto-INRup* i *Tto-INRdn* koje su umnožavale dio integraze retrotranspozona Tto1 oko introna II. Ovom metodom željeli smo provjeriti da li sve selektirane biljke na gentamicinu imaju ugrađen retrotranspozon u genomu iako nam ona ne daje podatak o njegovom broju kopija. Kao negativna kontrola testirana je i genomska DNA iz divljeg tipa uročnjaka (slika 3.17). Pozitivne kontrole ovog sustava detekcije bili su plazmidi Tto1 izolirani iz transformiranih bakterija *E.coli*. Obzirom da jedino plazmid pPZP221-Tto1 ne sadrži intron II u genu za integrazu, očekivani su fragmenti ostalih vektora veći za 94 pb (veličina int. II) od ovog vektora. Veličina umnoženog fragmenta bez introna je 413 pb a s intronom 507 pb. Elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu dobiveni su očekivani fragmenti (slike 3.18 i 3.19). Fragmenti su uspoređivani s onima iz DNA standarda: λ /HindIII ili DNA ljestve (100-10 000 pb). Razlika između dobivenih fragmenata je 94 pb što odgovara dužini introna II u integrazi.



Slika 3.17. Elektroforetsko razdvajanje produkata reakcije PCR s početnicama *Tto-INR* (up i dn) i genomskom DNA divljeg tipa (WT) uročnjaka (staze 1 i 2). Kontrole su plazmidi izolirani iz bakterije *E.coli*: pPZP221-Tto1 (staze 3 i 4) i pPZP221-Tto1-i (staze 5, 6 i 7). Korišteni standard: DNA ljestve 100-10 000 pb.



Slika 3.18. Elektroforetsko razdvajanje produkata reakcije PCR s početnicama *Tto-INTR* (up i dn) i genomskom DNA transformanata T_1 generacije. Kontrole su plazmidi izolirani iz bakterije *E.coli*: pPZP221-TTto1-ip (1), pPZP221-Tto1-i (8) i pPZP221-Tto1 u razrjeđenjima 1:10 (18), 1:15 (19) i 1:100 (20). Ostali brojevi označavaju različite linije biljaka transformiranih istim plazmidima. Korišteni standard (M): λ HindIII.

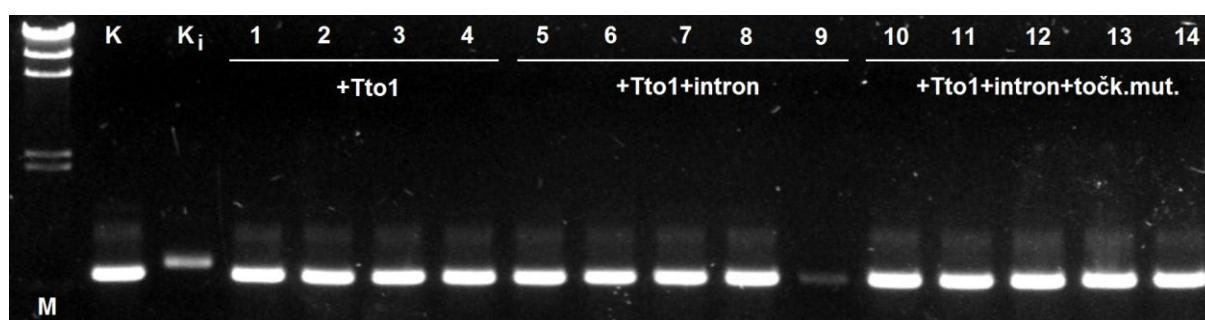


Slika 3.19. Elektroforetsko razdvajanje produkata reakcije PCR s početnicama *Tto-INTR* (up i dn) i genomskom DNA transformanata T_1 generacije. Kontrole su plazmidi izolirani iz bakterije *E.coli*: pPZP221-TTto1-ip (K_{ip}) i pPZP221-Tto1 (K). Brojevi označavaju različite linije transformanata. Korišteni standard (M): λ HindIII.

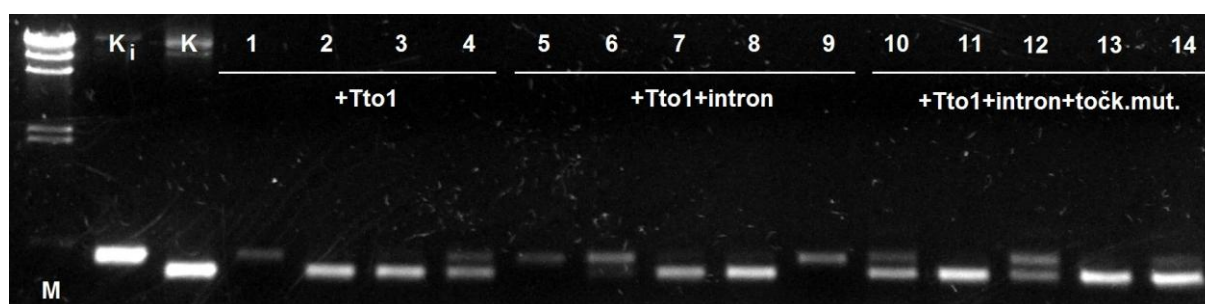
Pomoću početnica *Tto-INTR* utvrdili smo da sve testirane linije imaju prisutan intron II, osim onih transformiranih s vektorom pPZP221-Tto1, jedinim koji nema ugrađen intron. U T_1 generaciji transformanata ne možemo dokazati prisutnost novih kopija koje bi dale kraći fragment jer se ugradnja novih kopija očekuje tek u sljedećoj generaciji.

3.5 Analiza cDNA transgenih linija uročnjaka pomoću metode RT-PCR

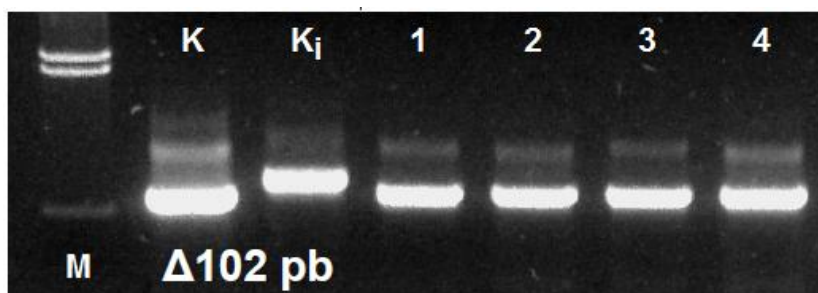
Da provjerimo transkripcijsku aktivnost *Tto1* u svim transgenim linijama uročnjaka, iz T_1 generacije izolirana je ukupna RNA pomoću Reagenta TRI. Ukupna mRNA je reverznom transkripcijom prepisana u cDNA. Reakcija PCR napravljena je s početnicama *Act3* (fw i rev) i *Tto-INTR* (up i dn) i cDNA kao kalupom. Početnice *Act3* koje omeđuju intron aktinskog lokusa koriste se kao unutarnja kontrola za detekciju genomske DNA eventualno zaostale u uzorku cDNA, te kao kontrola uspješnosti reverzne transkripcije. Nijedan umnoženi fragment s početnicama *Act3* ne smije imati intron kako bi bili sigurni da je kalup čista cDNA (slike 3.20 i 3.22). Reakcijom PCR s početnicama *Tto-INTR* i cDNA kalupom pokazano je da se *Tto1* transkribira u svim ispitanim linijama T_1 generacije (slike 3.21 i 3.23).



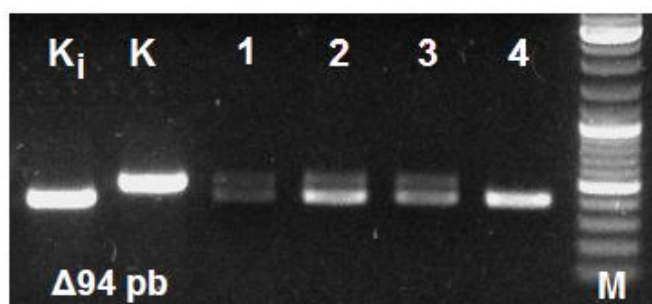
Slika 3.20. Elektroforetsko razdvajanje produkata reakcije PCR s početnicama *Act3* (fw i rev) i cDNA transformanata T_1 generacije. Kontrole su cDNA (K) i genomska (K_i) DNA divljeg tipa uročnjaka. Brojevi označavaju različite linije transformanata. Korišteni standard (M): λ /HindIII.



Slika 3.21. Elektroforetsko razdvajanje produkata reakcije PCR s početnicama *Tto-INTR* (up i dn) i cDNA transformanata T_1 generacije. Kontrole su plazmidi izolirani iz bakterije *E.coli*: pPZP221-TTo1-i (K_i) i pPZP221-Tto1 (K). Brojevi označavaju različite linije transformanata. Korišteni standard (M): λ /HindIII.



Slika 3.22. Elektroforetsko razdvajanje produkata reakcije PCR s početnicama *Act3* (fw i rev) i cDNA transformanata T₁ generacije (linije transformirane s pPZP221-Tto1-iPAT). Kontrole su cDNA (K) i genomska (K_i) DNA divljeg tipa uročnjaka. Brojevi označavaju različite linije transformanata. Korišteni standard (M): λ HindIII.

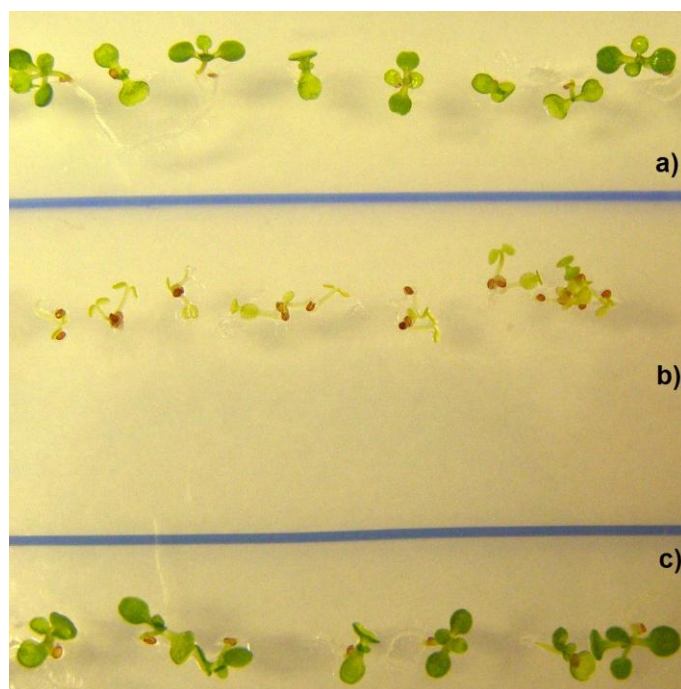


Slika 3.23. Elektroforetsko razdvajanje produkata reakcije PCR s početnicama *Tto-INTR* (up i dn) i cDNA biljaka T₁ generacije (linije transformirane s pPZP221-Tto1-iPAT). Kontrole su plazmidi izolirani iz bakterije *E.coli*: pPZP221-TTto1-i (K_i) i pPZP221-Tto1 (K). Brojevi označavaju različite linije transformanata. Korišteni standard (M): DNA ljestve 100-10 000 pb.

Na slikama je vidljivo da nijedan umnoženi fragment s aktinskim početnicama nema intron što znači da nema kontaminacije tj. genomske DNA u uzorcima cDNA. Također se vidi da je PCR s početnicama *Tto-INTR* u nekim linijama dao dvije vrste transkripata: kraći bez introna i duži s intronom. Moguća objašnjenja za ovakve rezultate su neefikasno izrezivanje (*splicing*) introna iz mRNA ili transkripcija koja bi mogla teći s 3'LTR kraja retrotranspozona. Čak su nađene kopije s intronom u linijama transformiranih s vektorom pPZP221-Tto1 što bi se moglo objasniti kontaminacijom uzorka ali kontrola s aktinskim početnicama je isključila tu mogućnost. U transformantima T₁ generacije intron II, točkasta mutacija i gen PAT ne utječu na transkripciju.

3.6 Detekcija novih kopija Tto1 putem BASTA selekcije

Biljke T_1 generacije su uzgajane u uvjetima dugog dana dok nisu dale zrelo sjeme (T_2 generacija). Sjemenke svih linija su sterilizirane i nasađene na podlogu PN(-S) s BASTA herbicidom. Biljke koje su narasle na podlozi su transformanti T_2 generacije. Na slici 3.24 su transformanti T_1 linija 2 i 3 čija je cDNA iz T_1 generacije analizirana metodom RT-PCR (slika 3.24, staze 2 i 3). Gen PAT koji biljkama omogućuje rezistenciju na BASTA herbicid, pod kontrolom je promotora (Pn) i terminatora (pAn) za nopalin sintetazu u suprotnoj orijentaciji od smjera transkripcije ORF-a retrotranspozona. Između gena PAT i njegovog promotora ugrađen je intron I koji se mora ukloniti za ekspresiju ovog gena. Međutim, on se ne može izrezati ukoliko transkripcija odmah počne s promotora Pn zbog suprotne orijentacije (slika 3.10). Prvo je potrebna transkripcija s 5'LTR-a kako bi se uklonio intron što se očekuje u T_1 generaciji transformanata. Tek nakon ugradnje cDNA u novi lokus moguća je uspješna transkripcija s promotora Pn i ekspresija rezistencije na herbicid u T_2 generaciji. Nakon selekcije s herbicidom obje testirane linije pokazale su rezistentan fenotip. To je, prema predhodno opisanom modelu, ukazivalo da Tto1 može završiti životni ciklus s ugrađenim genom biljegom.



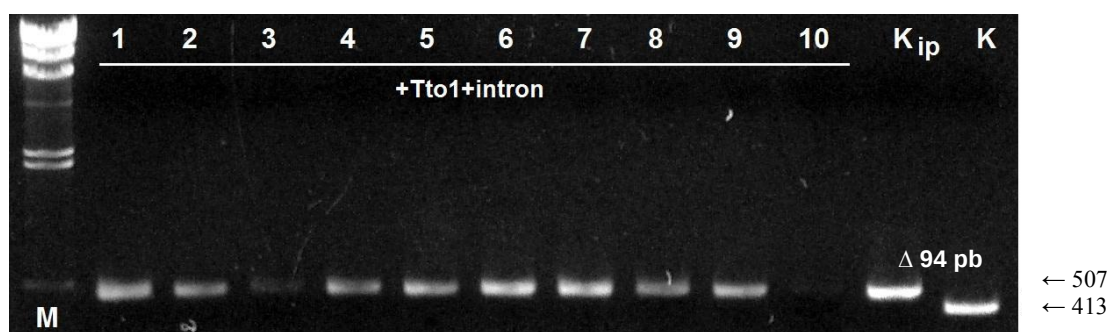
Slika 3.24. Transformanti uročnjaka T_2 generacije: a) linija 2; b) linija divljeg tipa; c) linija 3 na podlozi PN(-S) s BASTA herbicidom.

Međutim, analizom transgenih linija dobivenih upotrebom kontrolnog vektora pPZP221-Tto1-ipPAT s mutiranom integrazom (slika 3.12) na herbicidu BASTA, koja je predstavljala negativnu kontrolu, dobiveni su neočekivani rezultati. Naime, ta linija na BASTA podlozi nije smjela rasti jer točkasta mutacija onemogućava ugradnju novonastalih kopija Tto1 u genom. No, suprotno očekivanom, T₂ linije s mutiranom integrazom također su rasle na podlozi s herbicidom (rezultati nisu prikazani). Takav rezultat ukazivao je na dva scenarija: 1) da točkasta mutacija u integrasi ne inaktivira integrazu ili 2) da se gen PAT eksprimira bez obzira na ugrađen intron I ispred pripadajućeg ORF-a. Ova dilema riješena je nasadivanjem T₁ sjemenki linije transformirane s vektorom pPZP221-Tto1-ipPAT direktno na herbicidu (umjesto na gentamicin). Dobivene BASTA-rezistentne T₁ jedinke (rezultati nisu prikazani) ukazivale su da je konstrukt PAT transkripcijski i translacijski aktivan prije izrezivanja introna I (*leaky*). Takvi rezultati su praktički onemogućili indirektno praćenje životnog ciklusa Tto1 te se pristupilo strategiji utvrđivanja novih kopija putem PCR-a na kalupu genomske DNA.

3.7 Detekcija novih kopija pomoću lančane reakcije polimerazom

Obzirom da na temelju dobivenih rezultata s reporter genom nije bilo moguće pouzdano utvrditi da li u T₂ transgenim linijama imamo nove kopije Tto1, a što je bio preduvjet za sljedeće korake, isto je pokušano utvrditi pomoću metode PCR-a. Genomska DNA transformanata T₂ generacije testirana je s *Tto-1NR* početnicama kako bi se detektirale nove kopije retrotranspozona u genomu (slika 3.25).

Ove kopije ne bi smjele imati intron II jer je on trebao biti izrezan prilikom transkripcije (*splicing*) retrotranspozona. Ipak, u ispitanim linijama umnoženi su samo oni fragmenti koji su sadržavali intron (slika 3.25). Niti u jednoj testiranoj liniji nije ustanovljen kraći PCR produkt koji bi ukazivao na postojanje novih kopija u genomu. Neefikasno izrezivanje introna bi moglo objasniti ovakve rezultate jer bi onemogućilo ekspresiju funkcionalne integrale.



Slika 3.25. Elektroforetsko razdvajanje produkata reakcije PCR s početnicama *Tto-1NR* (up i dn) i genomskom DNA transformanata T₂ generacije (linije transformirane vektorom pPZP221-Tto1-iPAT). Kontrole su plazmidi izolirani iz bakterije *E.coli*: pPZP221-TTo1-ip (K_{ip}) i pPZP221-Tto1 (K). Brojevi označavaju različite linije transformanata. Korišteni standard (M): λ /HindIII.

4 RASPRAVA

U ovom radu istražena je mogućnost završetka životnog ciklusa različitih varijanti modificiranog retrotranspozona duhana Tto1 u transformiranim biljkama uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*). Prethodnim eksperimentima je Tto1, jedan od samo nekoliko danas aktivnih retrotranspozona, uspješno aktiviran u ovoj heterolognoj biljci (Okamoto i Hirochika 2000). Također, u inicijalnim istraživanjima sa sličnim konstruktima nije nedvosmisleno dokazano da Tto1 može stvoriti nove genomske kopije ukoliko ima ugrađen reporter gen (Jelenić 1997). Cilj ovog istraživanja bio je dokazati nove kopije (cDNA) retrotranspozona Tto1 unatoč dodatku gena biljega korištenjem konstrukata u modernijim binarnim vektorima uz korištenje intaktnog 5'LTR-a kao ishodišta transkripcije. Uspješan ishod ovakvog eksperimenta omogućilo bi ugrađivanje bilo kojeg gena biljke *A.thaliana* koji bismo željeli (in)aktivirati. Ugrađena sekvenca uročnjaka u retroelementu bi teoretski mogla nakon reverzne transkripcije, rekombinirati s homolognom endogenom sekvencom transformirane biljke. Naime, cDNA kao dvolančana DNA molekula nastala reverznom transkripcijom predstavlja potencijalni supstrat za HR. Za razliku od dosadašnjih pristupa problemu ciljane inaktivacije gena s T-DNA (jednolančanom ili dvolančanom), ovaj pristup otvorio bi vrata novim mogućnostima. T-DNA kao supstrat za HR relativno je kratkog vijeka i mehanizmi ugradnje u genom nisu potpuno jasni (Somers i Makarevitch 2004). Ideja s modificiranim retrotranspozonom razlikuje se u tome što se već u prvom koraku temelji na nasumičnoj ugradnji retroelementa u genom da bi se njegovom transkripcijom, možda mogla povećati učestalost HR-a u odnosu na ilegitalnu rekombinaciju. Kako bi se povećala koncentracija supstrata za HR i omogućilo duže prisustvo u sistemu trebalo je spriječiti ugradnju novonastale cDNA retrotranspozona klasičnim putem pomoću integraze. Točkasta mutacija unutar integraze onemogućila bi ugradnju cDNA u nova mjesta u genomu što bi rezultiralo nakupljanjem produkata reverzne transkripcije (cDNA). Prethodnim istraživanjima utvrđeno je da u genomu *A.thaliana* ne postoje retroelementi koji bi mogli osigurati integrazu za kompletiranje životnog ciklusa retrotranspozona Tto1 s nefunkcionalnim genom za integrazu (Jelenić 1997).

U svrhu provjere naših pretpostavki, konstruirano je pet vektora. Svi vektori/konstrukti zapravo su binarni vektori pPZP221 s ugrađenim (ne)modificiranim retrotranspozonom Tto1. Prvi konstrukt nazvan je pPZP221-Tto1 i jedini je s nemodificiranim retrotranspozonom te je

omogućio praćenje njegove transkripcijske aktivnosti putem RT-PCR-a. Budući da nisu postojale potpune mape inicijalnih vektora pBTto⁺, pBTto⁻, pBTtoⁱP' i pBcT (Jelenić 1997), sekvenciranjem se pokazalo da postoje manje modifikacije i na ovom konstrukt i to nedostatak 31 nukleotida na 5' kraju 5'LTR-a i 6 nukleotida na 3' kraju 3'LTR-a. No pokazalo se da ove promjene nisu utjecale na aktivnost Tto1. Konstrukt pPZP221-Tto1-i ima intron II u genu za integrazu i trebao je omogućiti detekciju novih kopija u genomu, pomoću PCR-a s početnicama koje omeđuju intron (94 pb), kako bi se razlikovala izvorna kopija od novih kopija koje bi tijekom transkripcije izgubile intron. Pretpostavka je bila da se intron pravilno izrezuje iz RNA prije reverzne transkripcije. Treći konstrukt, pPZP221-Tto1-ip, osim introna sadrži i točkastu mutaciju u genu za integrazu čineći ju nefunkcionalnom. Ovaj vektor je trebao akumulirati cDNA jer zbog točkaste mutacije ne bi trebao biti sposoban integrirati svoje nove kopije u genom. Ostala dva konstrukta sadrže gen biljeg PAT koji biljci daje rezistenciju na herbicid fosfinotricin (BASTA^R). Ovaj gen je izoliran iz bakterije *Streptomyces hygroscopicus* i pokazao se korisnim u ulozi selektivnog biljega u drugim bakterijama i u višim biljkama (Thompson i sur. 1987). PAT je ugrađen u duplikaciju od 39 pb između ORF-a i 3'LTR-a u obrnutoj orijentaciji, a njegova transkripcija je pod kontrolom promotora i terminatora za nopalinsintetazu (*nos*). Između promotora i PAT-a je intron I (85 pb). Ekspresija gena PAT moguća je tek nakon uspješno završenog životnog ciklusa tako izmijenjenog Tto1 jer je potrebno izrezivanje introna (85 pb). Prvo je potrebna transkripcija s 5'LTR-a kako bi se uklonio intron, a tek nakon ugradnje cDNA u novi lokus moguća je uspješna transkripcija s promotora *nos* i ekspresija rezistencije na herbicid. Vektor s opisanim modificiranim retroelementom nazvan je pPZP221-Tto1-iPAT. Peti vektor ima i točkastu mutaciju u genu za integrazu i nazvan je pPZP221-Tto1-ipPAT. Biljke s ovim vektorom ne bi smjele ispoljiti rezistenciju budući da se cDNA, zbog točkaste mutacije, ne bi smjela ugraditi u genom.

Kontrolnim digestijama dobiveni su očekivani fragmenti što je potvrdilo uspješnost kloniranja naših vektora. Obzirom da je fragment PAT na oba kraja omeđen restrikcijским mjestom *EcoRI*, bila je moguća i ugradnja fragmenta u obrnutoj orijentaciji (*antisense*). Digestijom s *BamHI* koji reže PAT na 3 mjesta, detektirani su i takvi događaji te je omogućena transformacija biljaka plazmidima sa *sense* orijentacijom fragmenta PAT. Iako je prethodno zabilježeno da Tto1 nije stabilan u agrobakterijama (Jelenić 1997), naši konstrukti su pokazali stabilnost, moguće zbog kratkog perioda inkubacije u kulturi prije same izolacije.

Plazmidi sadrže gen za rezistenciju na gentamicin unutar regije T-DNA, uz LB (*left border*) kraj. Prijenos T-DNA u genom se odvija od RB (*right border*) prema LB kraju (Hajdukiewicz i sur. 1994) tako da eksprimirana rezistencija na gentamicin ukazuje da je ugrađena cijela regija T-DNA zajedno s modificiranim Tto1. Selekcija sjemenki T₁ generacije na gentamicinu je prema tome korištena kako bi se eliminirale neuspješne transformacije. Genomska DNA transformanata T₁ generacije provjerena je i reakcijom PCR radi detekcije ugrađenih retrotranspozona. U svim linijama transformanata nađene su izvorne kopije retrotranspozona s intronom II osim u linija transformiranih s pPZP221-Tto1 koji jedini prvotno nije ni imao ugrađen intron. Reakcijom RT-PCR provjerena je mRNA iste generacije. Uz *Tto-INTR*, korištene su i početnice *Act3* za kontrolu RT-PCR-a. Naime, ove početnice omeđuju intron (102 pb) u genu za aktin koji se izrezuje transkripcijom tako da PCR s kalupom cDNA umnaža fragment bez introna. Kada bi u cDNA uzorku bilo ostataka genomske DNA, početnice *Act3* bi umnožile fragment s intronom. Sve testirane mRNA iz T₁ biljaka nisu bile kontaminirane genomskom DNA. RT-PCR s početnicama *Tto-INTR* trebao je rezultirati fragmentima bez introna II koji su se trebali izrezati prilikom transkripcije retroelementa. Ipak, u svim transformantima nađene su kopije (transkripti) sa i bez introna. Detektirane su i kopije s intronom u linija transformiranih s pPZP221-Tto1 vektorom. Moguće je više objašnjenja za kopije s intronom: neefikasno izrezivanje (*splicing*) introna iz mRNA, transkripcija koja je tekla s 3'LTR kraja retrotranspozona ili kontaminacija uzorka. Međutim, kontrole s aktinskim početnicama isključuju mogućnost kontaminacije jer se pokazalo da je u svim uzorcima čista cDNA. Neefikasno izrezivanje introna bi onemogućilo ekspresiju integraze i ugradnju novih kopija što je provjereno kasnije u genomskoj DNA generacije T₂. Transkripcija s 3'LTR kraja moguća je u eukariotima u kojima je već prethodnim istraživanjima opisana dvosmjerna transkripcija s istog promotora (Neil i sur. 2009). Prepisivanje s 3' kraja ne bi utjecalo na prisutnost introna koji je suprotne orijentacije (5'→3') i integraza bi i u tom slučaju bila nefunkcionalna.

Sljedeća generacija biljaka (s genom PAT) nasadena je na podlogu s herbicidom BASTA. Narasle su zelene biljke što je dokazalo uspješnost ekspresije gena PAT unutar retroelementa Tto1. No, i biljke s Tto1 i točkastom mutacijom u genu za integrazu, narasle su na podlozi BASTA. Pretpostavka je bila da se PAT ne može eksprimirati dok se nova kopija bez introna I ne ugradi u genom, a točkasta mutacija u integrazi je trebala spriječiti ugradnju. Zbog neočekivanih rezultata, nasadene su sjemenke koje su dale T₁ generaciju, direktno na

herbicide umjesto gentamicina. Ove biljke su također pokazale rezistenciju što znači da je gen za rezistenciju na herbicide BASTA transkripcijski i translacijski aktivan unatoč intronu I (*leaky*) i nije potrebno njegovo uklanjanje za ekspresiju gena PAT. Prethodnim istraživanjem utvrđena je inicijacija translacije gena PAT (u uročnjaku) sa start kodona (AUG) koji se razlikuje u jednoj bazi (AUC, GUG, ACG i CUG) i omogućuje rezistenciju na herbicide čak i niskom učestalošću ekspresije (Depeiges i sur. 2006). Obzirom da se intron I ne uklanja transkripcijom, možda translacija počinje negdje izvan originalnog start kodona gena PAT. Genomska DNA T₂ generacije s PAT-om također je provjerena metodom PCR-a radi detekcije novih kopija u genomu što nije bilo moguće u T₁ generaciji. U svim linijama nađene su kopije s intronom II i nije dokazana prisutnost novih kopija (Tto1 bez introna). Iz rezultata je jasno da integraza nije aktivna. Moguće je i da je položaj gena PAT onemogućio pravilnu reverznu transkripciju pa integraza nije mogla prepoznati nove kopije elementa kao supstrata za ugradnju ali ne objašnjava prisutnost introna u transkriptima T₁ generacije. Daljnjim istraživanjem trebala bi se provjeriti prisutnost točkaste mutacije u genu za integrazu te broj kopija retrotranspozona pomoću hibridizacije po Southern-u.

5 ZAKLJUČCI

- Retrotranspozon Tto1 je transkripcijski aktivan unutar stanica biljke *Arabidopsis thaliana* (uročnjak) unatoč manjim modifikacijama na njegovim dugim ponavljajućim slijedovima (5' LTR bez 31 pb na svom 5' kraju i 3' LTR bez 6 pb na svom 3' kraju).
- Retrotranspozon Tto1 je transkripcijski aktivan u uročnjaku unatoč ugrađenom genu biljegu, intronu (II) i točkastoj mutaciji u genu za integrazu.
- Konstrukti s (ne)modificiranim Tto1 su stabilni u *Agrobacterium tumefaciens* u uvjetima kratkotrajnog uzgoja.
- Ugrađeni gen PAT, biljci *Arabidopsis thaliana* omogućuje rezistenciju na herbicid BASTA.
- Gen biljeg PAT se eksprimira unatoč ugrađenom intronu (I) između gena i njegovog promotora.

6 LITERATURA

1. Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. (1993): *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C R Acad Sci Paris (Life Sciences) 316: 1194-1199.
2. Bechtold N., Jaudeau B., Jolivet S., Maba B., Vezon D., Voisin R., Pelletier G. (2000): The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. Genetics 155: 1875-1887.
3. Becker D. (1990): Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. Nucl Acids Res 18: 203.
4. Bleuyard J.Y., Gallego M.E., White C.I. (2006): Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. DNA Rep 5: 1-12.
5. Böhmendorfer G., Hofacker I.L., Garber K., Jelenic S., Nizhynska V., Hirochiko H., Stadler P.F., Bachmair A. (2005): Unorthodox mRNA start site to extend the highly structured leader of retrotransposon Tto1 mRNA increases transposition rate. RNA 11: 1181-1191.
6. Böhmendorfer G., Luxa K., Frosch A., Garber K., Tramontano A., Jelenic S., Weber M., Bachmair A. (2008): Virus-like particle formation and translational start site choice of the plant retrotransposon Tto1. Virology 373: 437-446.
7. Britt A.B. i May G.D. (2003): Re-engineering plant gene targeting. Trends Plant Sci 8: 90-95.
8. Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M. (1987): XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. Biotechniques 5: 376-379.
9. Capecchi M.R. (2001): Generating mice with targeted mutations. Nature Med 7: 1086-1090.
10. Capy P. (2005): Classification and nomenclature of retrotransposable elements. Cytogenet Genome Res 110: 457-461.
11. Clough S.J. i Bent A.F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 16: 735-743.
12. Depeiges A., Degroote F., Espagnol M.C., Picard G. (2006): Translation initiation by non-AUG codons in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants. Plant Cell Rep 25: 55-61.

13. Desfeux C., Clough S.J., Bent A.F. (2000): Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiol* 123: 895-904.
14. Endo M., Ishikawa Y., Osakabe K., Nakayama S., Kaya H., Araki T., Shibahara K., Abe K., Ichikawa H., Valentine L., Hohn B., Toki S. (2006): Increased frequency of homologous recombination and T-DNA integration in *Arabidopsis* CAF-1 mutants. *EMBO J* 25: 5579-5590.
15. Feschotte C., Jiang N., Wessler S.R. (2002): Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature Rev Genet* 3: 329-341.
16. Grandbastien M.A. (1998): Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci* 3: 181-187.
17. Hajdukiewicz P., Svab Z., Maliga P. (1994): The small versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25: 989-994.
18. Hanin M., Volrath S., Bogucki A., Briker M., Ward E., Paszkowski J. (2001): Gene targeting in *Arabidopsis*. *Plant J* 28: 671-677.
19. Hanin M. i Paszkowski J. (2003): Plant genome modification by homologous recombination. *Curr Opin Plant Biol* 6: 157-162.
20. Hanson K.D. i Sedivy J.M. (1995): Analysis of biological selections for high-efficiency gene targeting. *Mol Cell Biol* 15: 45-51.
21. Hansson G.K. (2007): Gene modification in mice. The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, Stockholm.
22. Havecker E.R., Gao X., Voytas D.F. (2004): The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biol* 5: 225
23. Hinnen A., Hicks J.B., Fink G. R. (1978): Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 1929-1933.
24. Hirochika H. (1993): Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *EMBO J* 12: 2521-2528.
25. Hirochika H., Otsuki H., Yoshikawa M., Otsuki Y., Sugimoto K., Takeda S. (1996): Autonomous transposition of the tobacco retrotransposon Tto1 in rice. *Plant Cell* 8: 725-734.
26. Hirochika H., Okamoto H., Kakutani T. (2000): Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation. *Plant Cell* 12: 357-368.

27. Hohn B. i Puchta H. (1999): Gene therapy in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8321-8323.
28. Iida S. i Terada R. (2004): A tale of two integrations, transgene and T-DNA: gene targeting by homologous recombination in rice. *Curr Opin Biotechnol* 15: 132- 138.
29. Iida S. i Terada R. (2005): Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants. *Plant Mol Biol* 59: 205-219.
30. Ishizaki T. i Kato A. (2005): Introduction of the tobacco retrotransposon *Tto1* into diploid potato. *Plant Cell Rep* 24: 52–58.
31. Jelenić S. (1997): Aktivnost retrotranspozona duhana *Tto1* u stanicama vrste *Arabidopsis thaliana* L. Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
32. Kazazian H.H., Jr (2004): Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303: 626-632.
33. Kempin S.A., Liljegren S.J., Block L.M., Rounsley S.D., Yanofsky M.F., Lam E. (1997): Targeted disruption in *Arabidopsis*. *Nature* 389: 802-803.
34. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996): Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to *Fok I* cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1156-1160.
35. Koncz C. i Schell J. (1986): The promoter of the TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204: 383-396.
36. Kumar A. (1998): The evolution of plant retroviruses: moving to green pastures. *Trends Plant Sci* 3: 371-374.
37. Kumar A. i Bennetzen J.L. (2000): Retrotransposons: central players in the structure, evolution and function of plant genomes. *Trends Plant Sci* 5: 509-510.
38. Kumar A. i Hirochika H. (2001): Applications of retrotransposons as genetic tool in plant biology. *Trends Plant Sci* 6: 127-134.
39. Kumar S., Allen G.C., Thompson W.F. (2006): Gene targeting in plants: fingers on the move. *Trends Plant Sci* 11: 159-161.
40. Li J., Hsia A.P., Schnable P.S. (2007): Recent advances in plant recombination. *Curr Opin Plant Biol* 10: 131-135.
41. Lyznik L.A., Gordon-Kamm W.J., Tao Y. (2003): Site-specific recombination for genetic engineering in plants. *Plant Cell Rep* 21: 925–932.

42. Manetti M.E., Rossi M., Costa A.P.P., Clausen A.M., Van Sluys M.A. (2007): Radiation of the TntI retrotransposon superfamily in three Solanaceae genera. *BMC Evol Biol* 7:34.
43. McCreath K.J., Howcroft J., Campbell K.H.S., Colman A., Schnieke A.E., Kind A.J. (2000): Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405: 1066-1068.
44. Miller W.J. i Capy P. (2004): Mobile genetic elements as natural tools for genome evolution. U Miller W.J. i Capy P. (ur.): *Mobile genetic elements (Methods in molecular biology vol. 260)*. Humana Press, New Jersey.
45. Neil H., Malabat C., d'Aubenton-Carafa Y., Xu Z., Steinmetz L.M., Jacquier A. (2009): Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* 457, 1038-1042.
46. Okamoto H. i Hirochika H. (2000): Efficient insertion mutagenesis of *Arabidopsis* by tissue culture-induced activation of the tobacco retrotransposon *Tto1*. *Plant J* 23: 291-304.
47. Page D.R., Grossniklaus U. (2002): The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Rev Genet* 3: 124-136.
48. Pearce S.R., Stuart-Rogers C., Knox M.R., Kumar A., Ellis T.H.N., Flavell A.J. (1999): Rapid isolation of plant Ty1-copia group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies. *Plant J* 19: 711-717.
49. Puchta H. (2002): Gene replacement by homologous recombination in plants. *Plant Mol Biol.* 48: 173-182.
50. Puchta H. i Hohn B. (2005): Green light for gene targeting in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11961-11962.
51. Qin M., Bayley C., Stockton T., Owt D.W.(1994): Cre recombinase-mediated site-specific recombination between plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1706-1710.
52. Rong Y.S. i Golic K.G. (2000): Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* 288: 2013-2018.
53. Sabot F. i Schulman A.H. (2006): Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome. *Heredity* 97: 381–388.
54. Schaefer D.G. i Zrýd J.P. (1997): Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* 11: 1195-1206.

55. Schaefer D.G. (2001): Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr Opin Plant Biol* 4: 143-150.
56. Schuermann D., Molinier J., Fritsch O., Hohn B. (2005): The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends Genet* 21: 172-181.
57. Shaked H., Melamed-Bessudo C., Levy A.A. (2005): High-frequency gene targeting in *Arabidopsis* plants expressing the yeast *RAD54* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12265-12269.
58. Shaked H., Avivi-Ragolsky N., Levy A.A. (2006): Involvement of the *Arabidopsis* *SWI2/SNF2* chromatin remodeling gene family in DNA damage response and recombination. *Genetics* 173: 985–994.
59. Shukla V.K. i sur. (2009): Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 437-443.
60. Slotkin R. K.i Martienssen R. (2007): Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Rev Genet* 8: 272-285.
61. Somers D.A. i Makarevitch I. (2004): Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes?. *Curr Opin Biotechnol* 15: 126-131.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. Takeda S., Sugimoto K., Kakutani T., Hirochika H. (2001): Linear DNA intermediates of the *Tto1* retrotransposon in Gag particles accumulated in stressed tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 28: 307-317.
66. Terada R., Urawa H., Inagaki Y., Tsugane K., Iida S. (2002): Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nature Biotechnol* 20: 1030-1034

67. Terada R., Asao H., Iida S. (2004): A large-scale *Agrobacterium*-mediated transformation procedure with a strong positive-negative selection for gene targeting in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep* 22: 653-659
68. Terada R., Johzuka-Hisatomi Y., Saitoh M., Asao H., Iida S. (2007): Gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics. *Plant Physiol* 144: 846-856.
69. Thomas K.R. i Capecchi M.R. (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived cells. *Cell* 51: 503-512.
70. Thompson C.J., Movva N.R., Tizard R., Cramer R., Davies J.E., Lauwereys M., Botterman J. (1987): Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* 6: 2519-2523.
71. Vicent C.M., Jääskeläinen M.J., Kalendar R., Schulman A.H. (2001): Active retrotransposons are a common feature of grass genomes. *Plant Physiol* 125: 1283-1292.
72. Wicker T., Sabot F., Hua-Van A., Bennetzen J.L., Capy P., Chalhoub B., Flavell A., Leroy P., Morgante M., Panaud O., Paux E., SanMiguel P., Schulman A.H. (2007): A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Rev Genet* 8: 973-982.
73. Wright D.A., Townsend J.A., Winfrey R.J., Jr, Irwin P.A., Rajagopal J., Lonosky P.M., Hall B.D., Jondle M.D., Voytas D.F. (2005): High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J* 44: 693-705.
74. Yagi T., Ikawa Y., Yoshida K., Shigetani Y., Takeda N., Mabuchi I., Yamamoto T., Aizawa S. (1990): Homologous recombination at *c-fyn* locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9918-9920.