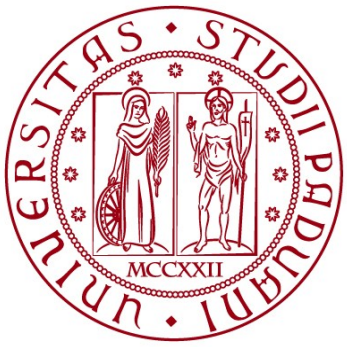
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

Una visione evolutiva sull'interazione tra i retrovirus ed il loro ospite

Tutor: Prof. Mauro Agostino Zordan
Dipartimento di Biologia

Laureando: Michele Marongiu

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

Sommario

L'evoluzione prevede un processo di adattamento. Tale processo non si limita solo ad organismi cellulari, ma è comune anche ai virus, parassiti cellulari obbligati. La famiglia virale dei retrovirus è capace di integrare il proprio genoma in quello dell'ospite, e se l'integrazione avviene in cellule della linea germinale il genoma virale può essere trasmesso alla generazione successiva, contribuendo all'evoluzione della specie. Integrando il proprio genoma in quello dell'ospite, i retrovirus si comportano come geni cellulari acquisiti. I retrovirus endogeni (E*ndogenous Retroviruses*, ERVs), resti genetici di infezioni virali, conferiscono nuove funzioni cellulari, spesso di tipo difensivo contro i virus stessi. *APOBEC3* (*A3*) è un gruppo genico presente nel genoma dei mammiferi, i cui geni codificano per delle citidine deaminasi con funzione antivirale. Nel corso del tempo *A3* è coevoluto insieme ai virus, in un continuo processo di adattamento e riadattamento, indice del fatto che una forte pressione ecologica può stimolare la rapida evoluzione di una specie. Gli ERVs oltre a conferire nuove funzioni cellulari possono essere utilizzati come strumenti di analisi metabolica, genetica e filogenetica, rendendo possibile la ricostruzione della storia evolutiva delle specie infettate e dei retrovirus stessi.

Stato dell'arte

Osservando il mondo naturale vediamo un enorme varietà di creature viventi, da minuscole cellule batteriche dell'ordine di qualche micrometro, ad enormi organismi multicellulari del calibro della balenottera azzurra lunga decine di metri. Ogni ambiente sulla Terra è stato colonizzato da una qualche forma di organismo vivente: dai profondi oceani, ai crateri vulcanici, dal suolo terrestre all'aria del cielo. La vita tende ad adattarsi, a mantenersi e perpetuarsi in un ambiente, combattendo contro le leggi naturali che inevitabilmente tendono ad un equilibrio non compatibile con la vita stessa. In questa battaglia per la sopravvivenza, la vita va incontro ad un'evoluzione. Ma cos'è esattamente l'evoluzione?

In biologia l'evoluzione è il cambiamento delle caratteristiche ereditabili di un gruppo di organismi lungo le generazioni. Tale processo è guidato da molteplici forze: la selezione naturale, la deriva genetica, le migrazioni e le mutazioni del codice genetico. Tutte queste forze agiscono, in modo diretto o indiretto, per far raggiungere uno stato ottimale di adattamento a ciascun organismo presente nell'ambiente. Alla base dell'evoluzione c'è una variazione del codice genetico, ed in ultima analisi, tutta la variabilità genetica deriva da mutazioni del codice stesso, eventi casuali come errori durante la replicazione del DNA, oppure indotti come nel caso dell'esposizione ad agenti mutageni. Le mutazioni modificano la sequenza genomica, nella quasi totalità dei casi senza provocare alcun cambiamento tangibile, ma si accumulano creando il contesto adatto per acquisire nuove funzioni. Tuttavia, le mutazioni non sono l'unico evento che introduce variabilità genetica, la ricombinazione, ad esempio, durante la formazione dei gameti, o la trasmissione genica orizzontale, come nella coniugazione batterica, contribuiscono entrambi ad aumentare la variabilità genomica secondo un processo di rimescolamento ed acquisizione rispettivamente.

In particolare, la trasmissione genica orizzontale non è limitata solo ai batteri, ma è comune anche ai virus, parassiti cellulari obbligati. I virus sono dell'entità più simili a macchine meccaniche che ad organismi viventi, incapaci di replicarsi autonomamente, a differenza di una cellula, quindi obbligati a sfruttare le risorse dell'ospite che infettano. Come per i procarioti e gli eucarioti, i virus hanno una propria suddivisione tassonomica, con moltissime famiglie, generi e specie. La famiglia dei *Retroviridae*, o semplicemente retrovirus, è una famiglia di virus ad RNA, in cui l'RNA genomico viene convertito a DNA grazie all'enzima trascrittasi inversa, una DNA polimerasi RNA dipendente, che usa un filamento di RNA come stampo per la sintesi di un filamento di DNA complementare, per poi integrare il DNA virale nel genoma cellulare (**Figura 1**). Da questo momento in poi il DNA virale è parte del DNA cellulare e si comporta come esso, prendendo il nome di provirus. Sfruttando l'apparato cellulare, i retrovirus inducono la produzione di proteine virali e la replicazione del genoma generando nuove unità virali, che una volta rilasciate all'esterno della cellula ripeteranno il ciclo d'infezione. Quando un retrovirus integra il proprio genoma in cellule della linea germinale (es. spermatozoi ed ovuli), il DNA virale potrà essere ereditato dalla generazione successiva, a differenza di un'infezione somatica, che teoricamente è limitata al solo organismo infetto. L'organismo prodotto dalla fecondazione di cellule infette sarà dunque portatore del genoma virale, o retrovirus endogeno (*Endogenous Retrovirus,* ERV), che si comporta come un nuovo allele acquisito trasmissibile alla progenie.

Gli ERV sono elementi molto comuni nei genomi dei vertebrati, tanto da comporre fino all'8% del genoma umano (Weiss, 2006), spesso definiti come dei "relitti" di infezioni passate. Nonostante la

loro grande abbondanza gli ERV sono nella quasi totalità dei casi inattivi, cioè impossibilitati a produrre copie funzionali di un virus.

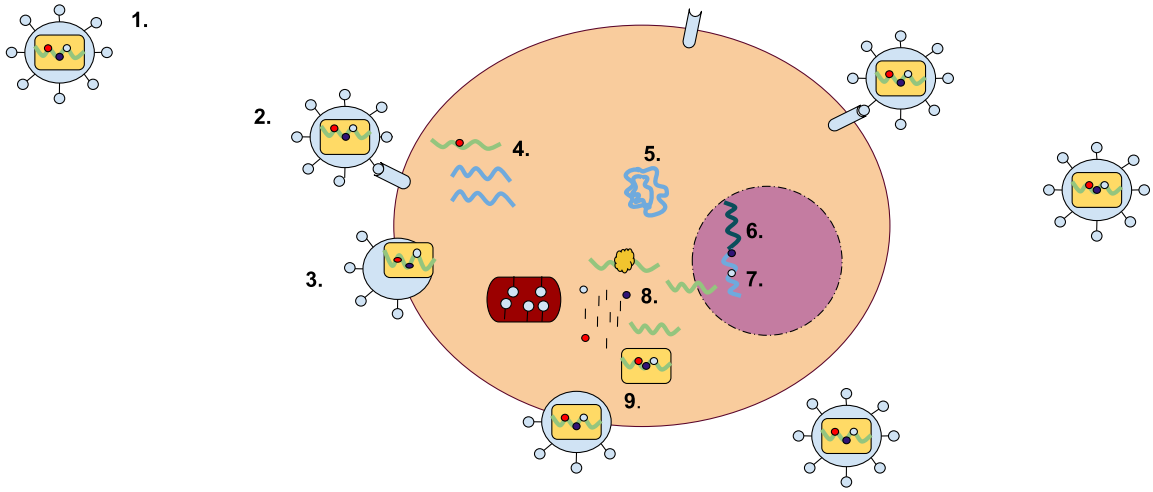


Figura 1: Rappresentazione schematica del ciclo d'infezione di un retrovirus. **(1)** Particella retrovirale. **(2)** Legame della glicoproteina virale al recettore. **(3)** Fusione tra membrana cellulare e capside virale con l'entrata dell'RNA virale nella cellula. **(4)** La trascrittasi inversa crea un filamento di DNA complementare (cDNA) all'RNA virale. **(5)** Il cDNA è utilizzato come stampo per il filamento complementare. Il DNA virale a doppio filamento entra nel nucleo. **(6)** Il DNA virale si integra nel DNA cellulare tramite l'azione dell'enzima integrasi. **(7)** La cellula può rimanere quiescente o iniziare a trascrivere l'RNA virale. **(8)** Traduzione dell'mRNA con produzione delle proteine del capside e gli enzimi virali. **(9)** Impacchettamento dell'RNA genomico e degli enzimi con rilascio di una nuova particella virale. Fonte: *https://web.archive.org/web/20221218194859/https://commons.wikimedia.org/wiki File:Life_Cycle_of_a_Retrovirus.svg*

Ciò si verifica per diverse ragioni, ad esempio per accumulo di mutazioni lungo le generazioni, che determina la produzione di proteine non più funzionali, oppure per ricombinazione omologa, in particolare a livello delle regioni terminali presenti all'estremità 5' e 3' del provirus, denominate *Long Terminal Repeats* (LTRs). In quest'ultimo caso, dopo l'evento di ricombinazione omologa si forma un singolo elemento chiamato soloLTR (**Figura 2**), in cui la porzione interna contenente i geni per la replicazione virale è rimossa, impedendo dunque la produzione di particelle virali. Pur essendo elementi virali inattivi i soloLTR possono avere diverse funzioni biologiche, agendo come promotori o enhancer durante la prima embriogenesi e lo sviluppo neuronale (Durnaoglu, Lee & Ahnn, 2021), nonché nell'insorgenza di alcune patologie, principalmente a causa della loro abilità d'interferire con l'espressione genica e la stabilità genomica inserendosi in porzioni codificanti di geni o regioni regolative come i promotori.

I geni *A3* fanno parte della famiglia genica *AID/APOBEC* (*Activation-induced mRNA editing enzyme, cytidine catalytic deaminase/apolipoprotein polypeptide-like*), codificano delle citosine deaminasi che catalizzano la conversione da citosina ad uracile (da C ad U). Questa famiglia genica presenta, oltre che diverse funzioni biologiche come la regolazione del metabolismo lipidico (*APOBEC1*) o dello sviluppo dei mioblasti (*APOBEC2*) (Salter, Bennett & Smith, 2016), la capacità di bloccare infezioni virali inducendo delle mutazioni nel genoma dei virus (*APOBEC3*). I geni *A3* sono raggruppabili in tre classi (A3Z1, A3Z2 e A3Z3) sulla base della sequenza conservata del dominio Z (Zinc dependent catalytic domain), contenente il motivo HxE/PCxxC (dove H: istidina, x: qualsiasi amminoacido, E: acido glutammico, P: prolina e C: cisteina) strettamente associato a diverse funzioni fisiologiche dei vertebrati, come l'omeostasi del sistema immunitario, la regolazione del metabolismo e per l'appunto il controllo di malattie infettive. Durante il corso dell'evoluzione i geni *A3* sono andati incontro a molteplici eventi di duplicazione genica, che ne ha permesso l'espansione e la radiazione (**Figura 3**). Tra i diversi geni A3

(APOBEC3A/B/C/D/F/G/H), il gene APOBEC3G (A3G) è particolarmente importante nel contrastare l'infezione di virus esogeni (Herpesvirus, Parvovirus, Papillomavirus ed Hepadnavirus) ed endogeni (ERV ed altri retrotrasposoni) (Modenini, Abondio & Boattini, 2022).

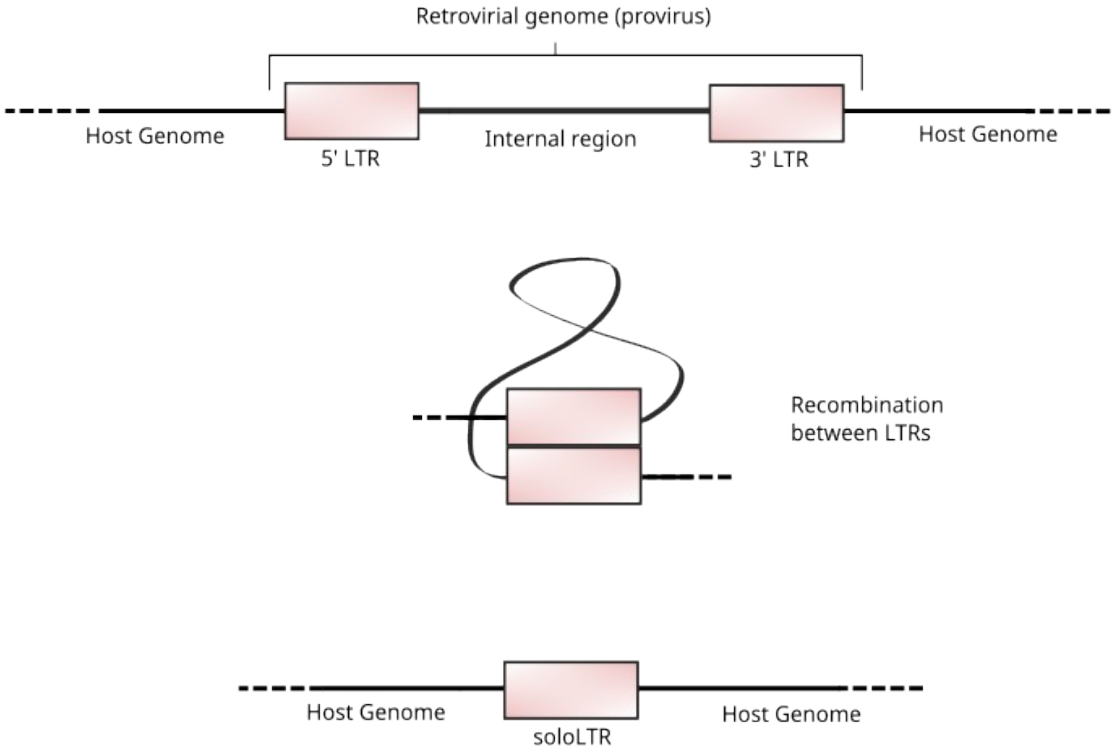


Figura 2: Formazione di un soloLTR tramite ricombinazione omologa dell'estremità 5' LTR e 3' LTR.

Nonostante l'ospite presenti molte difese nei confronti dei virus, tra cui i geni *A3*, questi a loro volta hanno sviluppato i propri sistemi difensivi e di elusione contro ospite. Un esempio è l'enzima Vif (*Viral Infectivity Factor*) di HIV-1 (*Human Immunodeficency Virus 1*), un retrovirus che bersaglia specificamente i linfociti T del sistema immunitario indebolendo la capacità difensiva dell'ospite. Vif interferisce con l'attività di A3G tramite un sistema ubiquitina-proteosoma dipendente, che culmina con la degradazione di A3G e l'avanzare dell'infezione. La battaglia tra ospite i virus non si limita solo ad A3G e Vif, ma è invece diffusa su più livelli fisiologici: CRISPR-Cas, le proteine argonauta, i siti di legami per i fattori di trascrizione del sistema dell'interferone, l'enzima Rag ricombinasi, l'endonucleasi di restrizione procariotiche, gli RNA PIWI-interacting ed i recettori dell'immunità innata sono alcuni esempi di difese antivirali evolute nel corso del tempo da procarioti ed eucarioti (Kaján et al., 2020). L'abbondante presenza nei vertebrati di sistemi difensivi antivirali anche molto diversi tra loro è indice del fatto che l'evoluzione di questi è guidata dalla pressione ecologica esercitata dai virus, che agisce come una forza selettiva, favorendo quegli organismi in grado di resiste all'infezione. Allo stesso modo anche i virus evolvono per fronteggiare le difese dell'ospite, in un continuo processo di adattamento e riadattamento, secondo quindi un meccanismo coevolutivo.

I retrovirus endogeni contribuiscono direttamente all'evoluzione dell'ospite. Oltre all'azione regolatrice dei soloLTR, i geni virali acquisiti al momento dell'integrazione possono essere sfruttati dall'ospite per sviluppare nuove funzioni cellulari. Un esempio è dato dai geni che codificano il capside virale (*envelope*, *env*), che agiscono sia nel processo di fusione tra il capside e la membrana cellulare, ma anche impedendo l'infezione di virus che utilizzano lo stesso recettore d'entrata del retrovirus stesso, rendendo quindi immune la cellula a future reinfezioni (Johnson, 2019). I geni

della Sincitina (*Syncityn*), la cui funzione nei virus è regolare il processo di fusione tra capside e membrana cellulare, sono sfruttati dai mammiferi e da alcune lucertole vivipare per indurre la fusione delle cellule della placenta, creando uno strato cellulare che separa l'animale in fase di sviluppo dal sistema immunitario materno potenzialmente letale per il feto.

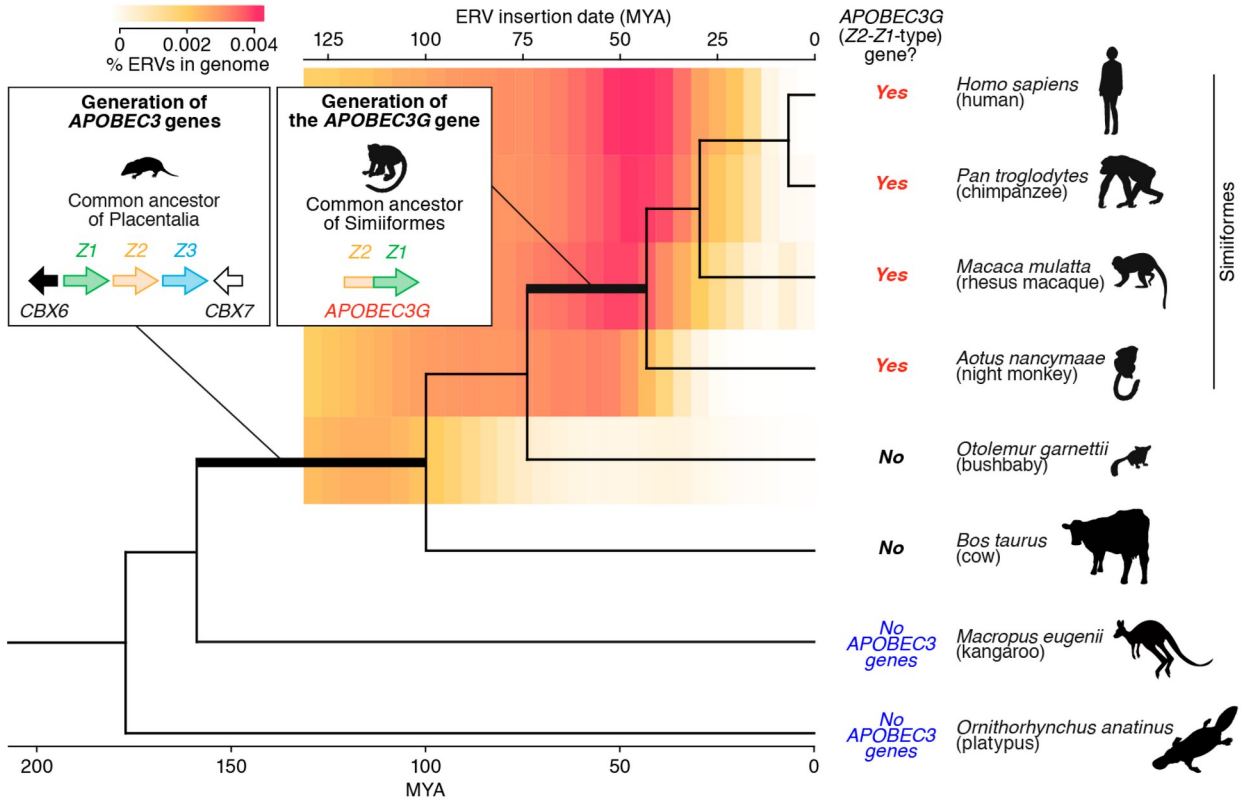


Figura 3: Nascita del gene *APOBEC3G*. I Monotremata (es. ornitorinchi) e i Marsupialia (es. canguri) non codificano i geni *APOBEC3* nel locus canonico (tra i geni *CBX6* e *CBX7*). Il gene *APOBEC3G* (*A3G*) è presente nei genomi degli ominidi (es. esseri umani e scimpanzé), delle scimmie del Vecchio Mondo (es. macachi rhesus) e delle scimmie del Nuovo Mondo (es. scimmie notturne) ma non in quelli delle proscimmie (es. bushbabies). *A3G* è presente nell'antenato comune dei Simiiformi. Poiché la nascita di *A3G* è corellata ad un periodo di notevoli invasioni di ERV nel genoma dei primati, si ipotizza che le infezioni retrovirali siano state una forza trainante nella generazione del gene *APOBEC3G*. MYA, milioni di anni fa. Fonte: *https://web.archive.org/web/20220308015036/https://www.mdpi.com/1999-4915/13/1/124*

La naturale presenza di ERV nei genomi degli eucarioti contribuisce alla loro evoluzione e può essere sfruttata per effettuare analisi filogenetiche sugli eucarioti e sui virus stessi. La spiccata tendenza, in particolare per virus ad RNA, di mutare il proprio genoma rende difficile se non impossibile la ricostruzione della storia evolutiva dei virus nel corso di milioni di anni. La presenza di elementi virali endogeni può rappresentare "un'istantanea" del genoma virale al momento dell'infezione, permettendo di osservare come nel corso del tempo i virus sono evoluti. Tuttavia, questo è possibile solo per quelle specie capaci di integrare il proprio genoma in quello dell'ospite, ed in particolare solo per quei virus in grado di infettare la linea germinale, ossia una parte minima di tutte le specie virali.

La seguente tesi analizza la storia evolutiva dei geni *A3*, soffermandosi sulle metodologie ed i risultati ottenuti tramite l'analisi filogenetica dei genomi di 160 specie di mammifero, dimostrando come l'azione dei geni *A3* e l'avvento di infezioni virali nel tempo siano eventi strettamente correlati.

Approccio sperimentale

Dati di sequenziamento

I dati di sequenziamento genomico e di RNA-Seq dei 160 mammiferi analizzati sono stati recuperati dal database pubblico dell'NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e del NHPRTR (*NonHuman Primate Reference Transcriptome Resource*). Le sequenze degli elementi trasponibili (*Transposable Elements*, TEs) sono state ottenute tramite il programma *RepeatMasker*.

Gli elementi trasponibili sono porzioni di DNA in grado di muoversi lungo il genoma. In base all'intermedio attraverso cui si muovono vengono divisi in due classi: elementi trasponibili di classe I (o retrotrasposoni), in grado di formare un intermedio ad RNA che successivamente è convertito in DNA dall'enzima trascrittasi inversa e poi integrato nel genoma, oppure elementi trasponibili di classe II (o trasposoni a DNA), dove l'intermedio è a DNA e questo viene escisso ed integrato nel genoma grazie all'enzima trasposasi. La struttura di un retrotrasposone è simile a quella di un ERV, anche se quest'ultimo è più complesso e probabilmente ha un'origine evolutiva diversa rispetto ai retrotrasposoni (Eickbush & Malik, 2007).

RepeatMasker è un programma di ricerca in sequenza di regioni ripetute e a bassa complessità. Esegue un confronto con un database di riferimento, in questo caso Repbase (specifico per i TE), per produrre una versione annotata del genoma che contiene le porzioni ripetute. Inoltre, la versione annotata del genoma può essere "mascherata" per facilitare l'identificazione delle sequenze ripetute, in questo modo le sequenze sono solitamente convertite in una stringa di caratteri, di solito il carattere "N", permettendo ai ricercatori di concentrasi solo sulle regioni uniche del genoma. Gli autori hanno utilizzato RepeatMasker in combinazione con il motore di ricerca RMBlast, una versione specifica per RepeatMasker del noto motore di ricerca BLASTn sviluppato dall'NCBI.

BLASTn è una delle tante varianti del pacchetto BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), specifico per il confronto di sequenze nucleotidiche (**Figura 4**). BLASTn funziona secondo i seguenti passaggi:

1. **Identificazione delle parole**: BLASTn inizia generando delle "parole" (oppure "kappameri" o "k-mer") di una certa lunghezza a partire dalla *query* (**Figura 4.1**). I k-mer sono poi confrontati con le sequenze del database. La dimensione delle parole determina la precisione dell'algoritmo, dove parole più lunghe conferiscono una maggiore precisione.
2. **Estensione delle parole**: una volta identificato un k-mer nelle sequenze del database, BLASTn cerca di estendere la corrispondenza ad entrambe l'estremità della sequenza, e l'estensione avanza finché il punteggio dell'allineamento continua ad aumentare. Il punteggio si basa su una matrice di sostituzione che assegna un valore alle corrispondenze tra parole e sequenza, alle mancate corrispondenze e ai "buchi" (*gap*). Se il punteggio dell'allineamento esteso supera una certa soglia definita dall'algoritmo, viene chiamato *High-scoring Segment Pair* (HSP).
3. **Valutazione degli HSP**: ogni HSP viene valutato statisticamente. BLASTn calcola il valore di aspettativa (*Expected value*, E-value) per ogni HSP, cioè il numero di volte in cui ci si aspetta che un particolare HSP sia presente per caso in una ricerca nel database. Più basso è l'E-value, più significativa è la corrispondenza.

4. **Risultati**: infine, BLASTn riporta le corrispondenze che hanno un E-value inferiore a una certa soglia. I risultati includono informazioni come l'identità delle sequenze, le basi corrispondenti, i gap e l'allineamento completo tra la query e le corrispondenze del database.

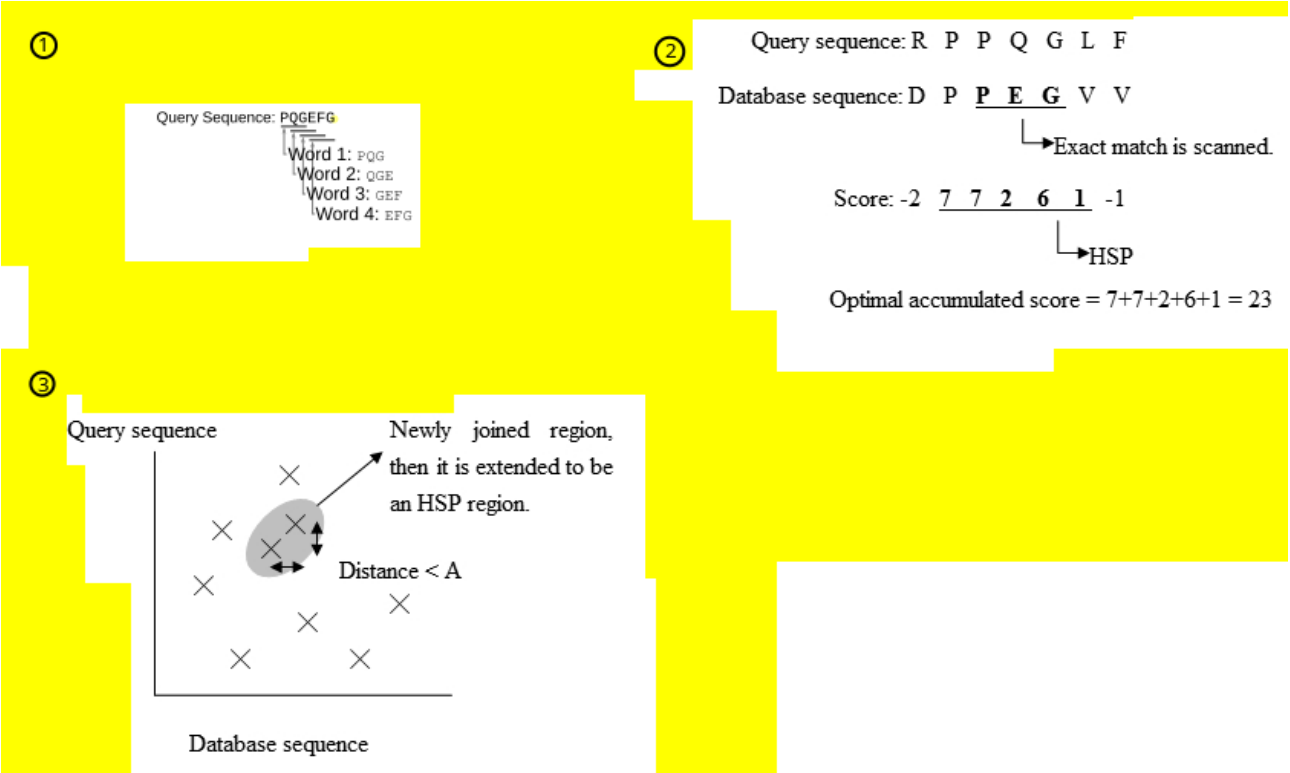


Figura 4: **(1)** Scelta delle parole ("kappameri", kmer). **(2)** Allineamento di sequenza ed identificazione dei punti in comune **(3)** Estensione delle parole. Immagine riadattata da: *https://web.archive.org/web/20230522143431/https://en.wikipedia.org/wiki/BLAST_(biotechnology)*

Analisi genomica e ricostruzione filogenetica

La ricerca di sequenza delle proteine AID/APOBEC nei genomi di 160 specie di mammifero è stata effettuata usando il programma DIGS (*Database Integrated Genome Screening*). DIGS effettua una ricerca per similarità tra le sequenze in analisi ed i genomi di rifermento: il programma produce un insieme di database relazionali utilizzabili per effettuare una ricerca completa su database genomici, usufruendo di diversi strumenti di ricerca come BLAST.

tBLASTn è un'ulteriore variante di BLAST, capace di confrontare una sequenza proteica, ossia di amminoacidi, verso tutti e sei i possibili frame di lettura di una sequenza nucleotidica; infatti, ogni sequenza nucleotidica può essere convertita in una sequenza proteica in sei diversi modi: in tre frame forward (lettura dall'inizio della sequenza), oppure tre frame reverse (lettura dalla fine della sequenza). Ogni frame inizia da una posizione nucleotidica diversa (prima, seconda o terza), scelta arbitrariamente, e può produrre sequenze proteiche diverse.

DIGS funziona secondo i seguenti passaggi:

1. **Creazione del database**: a partire da delle sequenze proteiche note, tBLASTn genera un database di sequenze nucleotidiche. Questo database è utilizzato come riferimento per confrontare la sequenze genomiche depositate nelle banche dati.

2. **Annotazione del genoma**: l'annotazione è il processo di identificazione della posizione di geni, sequenze virali, TE, ecc. e di determinazione delle funzioni di tali elementi. DIGS sfrutta l'annotazione genomica per determinare su quali parti del genoma concentrarsi durante il processo di screening, al fine di velocizzare la ricerca per similarità tra le sequenze in esame e i genomi di riferimento scartando tutte quelle sequenze non rilevanti.
3. **Screening per omologia**: DIGS esegue uno screening per omologia tramite BLAST, cioè effettua una ricerca per similarità tra le sequenze in esame e i genomi di riferimento.
4. **Classificazione delle sequenze**: le sequenze identificate vengono classificate in base alla loro somiglianza con le sequenze proteiche note del database.
5. **Risultati**: i risultati dello screening e della classificazione vengono visualizzati in un formato facile da usare, al fine di facilitare la comprensione dei dati.

Le sequenze proteiche AID/APOBEC utilizzate dagli autori appartengono a 5 specie animali (umano, topo, mucca, pipistrello della frutta e gatto). I risultati positivi, cioè le 1420 sequenze genomiche che mostravano una relazione di omologia con la famiglia AID/APOBEC, sono state filtrate per rimuovere eventuali regioni di corta lunghezza ed a bassa affinità. La filtrazione è stata effettuata usando come valore soglia un Bit-score > 50, un parametro che fornisce una misura della similarità di sequenza, indipendente dalla lunghezza della query e dalle dimensioni del database: più è alto il valore del bit-score, più due sequenze sono simili e significative. Dai risultati positivi è stata estratta una regione conservata a tutte le sequenze, e le sequenze in grado di coprire il 70% di questa regione sono state utilizzate per effettuare una serie di allineamenti multipli (*Multiple Sequence Alignments,* MSA) tramite l'algoritmo L-INS-I del programma MAFFT (*Multiple Alignment Fast Fourier Transform*). Infine, gli MSA sono stati utilizzati per costruire un albero filogenetico secondo il metodo Neighbor-Joining (NJ) implementato in MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).

Un albero filogenetico (**Figura 3**) è un grafico formato da nodi e rami, utilizzato per rappresentare le relazioni evolutive tra organismi, dove ogni nodo è un'unità tassonomica e i rami indicano le relazioni evolutive tra i nodi in termini di ascendenza e discendenza. I nodi terminali sono le unità tassonomiche più recenti, mentre i nodi interni quelle più antiche.

Gli allineamenti multipli di sequenza sono delle tecniche di analisi filogenetica che utilizzano diverse tipologie di algoritmi per ricostruire le relazioni evolutive tra gli organismi. MAFFT è un programma per la creazione di MSA che utilizza algoritmi basati sull'allineamento progressivo, in cui sequenze simili sono raggruppate secondo la trasformazione di Fast Fourier. La trasformazione di Fast Fourier (FFT) viene solitamente usata per accelerare il processo di confronto delle sequenze, ed in MAFFT implica la conversione di dati discreti (sequenze di basi azotate o amminoacidi) in componenti numeriche definite sulle proprietà fisiche (carica, volume, forma, ecc.) delle singole basi/amminoacidi. In questo modo le sequenze numeriche generate possono essere elaborate più efficientemente, riducendo il tempo di allineamento tra sequenze. Questo è particolarmente utile quando si lavora con grandi serie di dati poiché riduce significativamente il tempo di calcolo computazionale.

L'algoritmo L-INS-I implementato in MAFFT viene utilizzato per l'allineamento di poche sequenze (~200) e garantisce un'elevata accuratezza. L-INS-I effettua un allineamento locale a coppie basato sull'algoritmo di Smith-Waterman (SW), per poi procedere ad effettuare un allineamento multiplo. L'algoritmo di Smith-Waterman funziona creando una matrice di punteggio (*scoring matrix*) a

partire dall'allineamento di due sequenze e determina gli allineamenti locali migliori massimizzando il grado di somiglianza, basandosi su un determinato modello di punteggio che tipicamente assegna i valori per corrispondenza (*match*), mancata corrispondenza ed eventuali gap.

MEGA X è un pacchetto di programmi per la costruzione di MSA, predizione di alberi filogenetici, stima delle distanze genetiche e diversità di sequenza, predizione di sequenze ancestrali e per testare l'effetto della selezione, in grado di lavorare su sistemi operativi diversi (Microsoft Windows e Linux). Il metodo Neighbor-Joining implementato in MEGA X costruisce un albero filogenetico a partire da un MSA calcolato sull'insieme dei taxa (unità tassonomiche, ad esempio "specie") studiati.

Il metodo NJ lavora tramite una matrice di distanza, che calcola la distanze di tutte le coppie di taxa. Queste distanze possono essere determinate utilizzando una varietà di metriche, a seconda del tipo di dati e dei requisiti specifici dell'esperimento. L'obiettivo del metodo NJ è trovare una struttura ad albero (una rappresentazione grafica delle relazioni evolutive tra le sequenze) che spieghi al meglio le distanze osservate. Il metodo Neighbor-Joining funziona secondo i seguenti passaggi:

1. **Calcolo delle lunghezze dei rami**: l'algoritmo inizia calcolando la somma delle distanze tra a coppie tra tutti i taxa. Questo viene utilizzato per stimare la lunghezza dei rami dell'albero filogenetico.
2. **Scelta della coppia di taxa da unire**: la coppia di taxa che minimizza la lunghezza totale del ramo (la coppia che è "più vicina" secondo la metrica di distanza scelta) viene selezionata per essere unita all'albero.
3. **Aggiornamento della matrice di distanza**: la matrice di distanza viene aggiornata per riflettere l'unione dei due taxa. Le distanze dal nuovo nodo (che rappresenta il taxa unito) da tutti gli altri taxa sono calcolate utilizzando una media delle distanze dei due taxa originali da questi altri taxa.
4. **Iterare fino al completamento:** le fasi 2 e 3 vengono ripetute finché non rimangono solo due taxa. Questi vengono uniti per formare il ramo finale dell'albero.

Il risultato del metodo NJ è una struttura ad albero che rappresenta le relazioni evolutive tra le sequenze, con lunghezze dei rami proporzionali alle distanze evolutive stimate tra di esse.

Analisi di sequenza

Gli MSA in-frame, in cui le sequenze sono allineate in modo da preservare i frame di lettura, sono stati generati tramite un algoritmo d'allineamento specifico per i codoni, implementato nel programma MUSCLE (*MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation*). MUSCLE funziona secondo i seguenti passaggi:

1. **Creazione di una bozza**: MUSCLE inizia creando un allineamento progressivo, un allineamento rapido e approssimativo. Ciò avviene in tre fasi:
    i. **Calcolo delle distanze**: MUSCLE calcola le distanze "k-mer" tra tutte le coppie di sequenze per creare una matrice di distanza.

ii. **Raggruppamento UPGMB**: la matrice di distanza viene poi utilizzata per costruire un albero guida utilizzando il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

iii. **Allineamento progressivo**: l'albero guida viene utilizzato per creare un allineamento progressivo, partendo dalla coppia di sequenze più simili e procedendo in ordine decrescente.

2. **Fase progressiva migliorata**: in questa fase MUSCLE migliora l'allineamento iniziale della bozza. Ciò avviene in due fasi:

   i. **MUSCLE inizia creando un nuovo albero guida**: il nuovo l'albero si basa sulla bozza di allineamento della fase precedente, anziché sulle sequenze originali. Ciò significa che il nuovo albero guida è più accurato perché tiene conto delle informazioni sull'omologia posizionale contenute nella bozza di allineamento.

   ii. **Secondo allineamento progressivo**: viene utilizzato il nuovo albero guida per effettuare un secondo allineamento progressivo. Il risultato è un allineamento migliorato delle sequenze.

3. **Rifinitura**: in questa fase finale MUSCLE perfeziona l'allineamento per migliorarlo ulteriormente. Le fasi coinvolte sono:

   i. Utilizzo di un algoritmo di partizione ristretta dipendente dall'albero per dividere le sequenze in due insiemi.

   ii. Ricerca di un allineamento ottimale esplorando i possibili allineamenti tra sequenze all'interno di ciascun insieme. Ciò avviene attraverso un processo iterativo, in cui l'algoritmo riallinea ripetutamente le sequenze fino a quando non riesce più a migliorare ulteriormente il punteggio di allineamento. Il risultato è un allineamento migliorato al massimo.

Per determinare il grado di similarità tra le sequenze allineate è stato calcolato il punteggio entropico di Shannon su ciascuna posizione dell'allineamento. Il punteggio entropico di Shannon è un metodo quantitativo per determinare la variabilità di un gruppo di dati. In bioinformatica (ed in questo esperimento) viene utilizzato per quantificare la variabilità delle singole posizioni in un allineamento multiplo. Il punteggio viene calcolato per ogni posizione dell'allineamento fornendo una misura della variabilità di ciascuna posizione, dove posizioni con punteggi bassi sono molto conservate (Valdar, 2002).

Al fine di rilevare i codoni sotto selezione diversificante il rapporto dN/dS è stato calcolato utilizzando il modello del sito ramificato implementato nel programma HyPhy MEME (*Hypothesis Testing using Phylogenies - Mixed Effects Model of Evolution*).

Il modello del sito ramificato (*branch-site*) è una tecnica usata nell'analisi filogenetica per individuare la selezione positiva (in questo caso diversificante) su singoli codoni di specifici lignaggi (o rami) di un albero filogenetico. Questo modello consente al rapporto dN/dS di variare, sia tra i siti della proteina sia tra i rami dell'albero, ed inoltre fornisce un quadro statistico per verificare l'ipotesi di selezione positiva che agisce su rami specifici in corrispondenza di determinati codoni.

HyPhy è un pacchetto di programmi per l'analisi di sequenze genetiche tramite tecniche filogenetiche, molecolari ed apprendimento automatico (*machine learning*). MEME (*Mixed Effects Model of Evolution*) è un metodo implementato in HyPhy, progettato per individuare la selezione diversificante episodica. A differenza di altri metodi che presuppongono che la selezione agisca costantemente su tutti i rami dell'albero filogenetico, MEME consente alla selezione in un sito di variare da ramo a ramo, e ciò rende MEME particolarmente potente per individuare la selezione positiva che interessa solo un sottoinsieme di lignaggi.

In genetica delle popolazioni, la selezione diversificante (o divergente) descrive come la selezione di uno o più tratti favorisca valori estremi di quei tratti rispetto valori più intermedi, mentre il rapporto dN/dS (oppure Ka/Ks) è una misura della variazione genetica e viene calcolato tra il numero di sostituzioni non sinonime (dN), cioè che cambiano l'aminoacido nella sequenza proteica, e sinonime (dS), dove non vi è sostituzione dell'amminoacido. Un rapporto dN/dS > 1 viene considerato come un segno di selezione diversificante ed indica come le mutazioni sono state fissate durante l'evoluzione (Del Amparo et al., 2021), cioè la selezione naturale ha agito positivamente per fissare nella popolazione quelle mutazioni perché conferivano un vantaggio adattativo. Dal calcolo del rapporto dN/dS è stato costruito un albero filogenetico tramite il metodo della massima verosimiglianza implementato in MEGA X.

Il metodo della massima verosimiglianza è un approccio statistico, che stima i parametri di un modello massimizzando la funzione di verosimiglianza. Questa funzione misura la bontà di adattamento di un modello statistico ad un campione di dati per determinati valori dei parametri sconosciuti. Il metodo della massima verosimiglianza viene utilizzato per stimare l'albero filogenetico che con maggiore probabilità ha dato origine ai dati osservati (le sequenze), dato uno specifico modello di evoluzione delle sequenze. Questo modello descrive il modo in cui le sequenze mutano e si evolvono nel tempo e include parametri come la frequenza delle basi, i rapporti di transizione/trasversione ed il tasso di variazione tra i siti. Il metodo della massima verosimiglianza funziona secondo i seguenti passaggi

1. **Scelta del modello d'evoluzione delle sequenze**: diversi modelli fanno ipotesi diverse sul processo di evoluzione e la scelta di modello rispetto ad un altro può avere un impatto significativo sull'albero risultante. I modelli comunemente utilizzati sono Jukes-Cantor, Kimura a 2 parametri e *General Time Reversible* (GTR).
2. **Calcolo della verosimiglianza dei dati in base all'albero**: per ogni possibile albero, si calcola la probabilità dei dati osservati (le sequenze) in base a quell'albero e al modello di evoluzione scelto. Ciò comporta la somma di tutte le possibili assegnazioni di nucleotidi o amminoacidi ai nodi interni dell'albero.
3. **Determinazione dell'albero che massimizza la probabilità**: l'albero che risulta più probabile viene scelto come albero di massima verosimiglianza. Poiché il numero di alberi possibili cresce molto rapidamente con il numero di sequenze, per esplorare lo spazio degli alberi possibili si utilizzano in genere metodi di ricerca euristici, che consento di filtrare gli alberi migliori generalmente impostando un valore di soglia (*threshold*) sotto cui tutti gli altri alberi sono automaticamente scartati.

Calcolo della distorsione su mutazioni di sequenza

Eventuali distorsioni (*bias*) nel calcolo del tasso di mutazione da guanina ad adenina (da G ad A) negli ERV e TE sono stati presi in considerazione per valutare correttamente il livello di accumulo delle mutazioni da G ad A. Inizialmente è stato calcolato il numero di cambiamenti nucleotidici rispetto la sequenza consenso dei TE tramite un allineamento a coppie effettuato con RepeatMasker, scartando quei TE a bassa confidenza (punteggio di Smith-Waterman < 1). Successivamente, sono stati calcolati i tassi di mutazione da G ad A per i filamenti senso ed antisenso di ciascun TE, ed infine il punteggio di bias di sequenza è stato definito come un rapporto del tasso di mutazione G/A tra il filamento positivo e quello negativo. La significatività statistica del bias è stata valutata mediante il test esatto di Fisher, mentre il tasso di falsi positivi è stato calcolato secondo il test statistico di Benjamini-Hochberg.

Stima delle date di inserzione degli ERV

Le date di inserzione degli ERV sono state stimate utilizzando:

1. **Metodi basati sulla distribuzione ortologa**. I metodi basa sulla distribuzione ortologa valutano la presenza o assenza di geni ortologhi, cioè geni di specie differenti evoluti per speciazione da un gene ancestrale di un antenato comune (**Figura 5**), spesso mantenendo le stesse funzioni nel corso dell'evoluzione. La presenza di un ERV in geni ortologhi indica come probabilmente il retrovirus si è integrato nell'antenato comune delle specie in analisi, viceversa l'assenza indica che l'evento d'integrazione è probabilmente avvenuto dopo la speciazione. Ciò è stato determinato tramite l'utilizzo del programma Liftover e dei "file a catena" (*chain files*) dell'UCSC Genome Browser (*University of California Santa Cruz*), che converte le coordinate genomiche di inserzione degli ERV di una specie ad un'altra. Se la conversione ha successo, è probabile che la copia ortologa dell'ERV sia presente nel genoma corrispondente. I chain files sono un formato specifico per gli allineamenti a coppie, in particolare per quelli che presentano grossi buchi a causa di inserzioni e delezioni, utilizzati essenzialmente per convertire le coordinate di un assemblaggio genomico (*genome assembly*) ad un altro. Questi file sono utilizzati in Liftover per confrontare le coordinate di annotazione dei genomi di due specie diverse, o di due versioni differenti dello stesso genoma (ad esempio quando questo viene aggiornato in seguito a nuove scoperte). Nel caso degli ERV di topo, gli autori hanno prima convertito le coordinate genomiche degli ERV da Mm9 in quelle in Mm10 (l'ultima versione del genoma di riferimento del topo) e successivamente le coordinate genomiche in Mm10 sono state convertite in quelle dei genomi di specie sempre più distanti.
2. **Metodi basati sulla distanza genetica**: la distanza genetica di ciascun ERV è calcolata a partire da una sequenza consenso che rappresenta il lignaggio specifico da cui deriva l'ERV. Le distanze genetiche sono state convertite in stime temporali utilizzando un orologio molecolare neutro, cioè con un tasso di mutazione costante nel tempo. Per primati, insettivori e marsupiali è stato utilizzato un tasso neutro di $2,2 \times 10^{-9}$ mutazioni all'anno per sito. Per i roditori, che presentano un tasso rapido di mutazione, è stato utilizzato un tasso di $7,0 \times 10^{-9}$ mutazioni all'anno per sito.

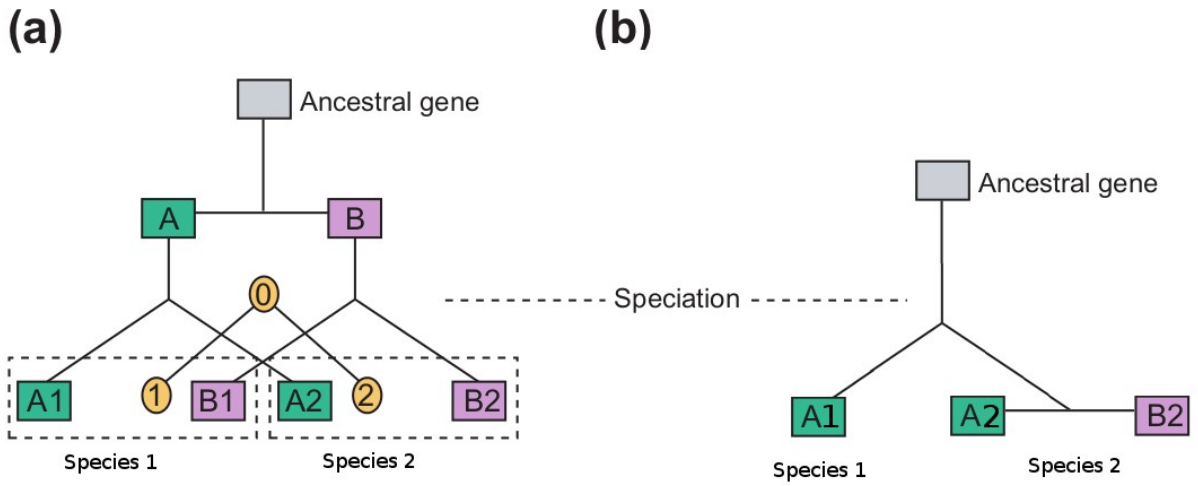


Figura 5: **(a)** Evoluzione di un ipotetico gene ancestrale. La specie ancestrale aveva due copie del gene (A e B), tra loro paraloghe. Ad un certo punto, l'organismo ancestrale si è diviso in due specie, ognuna delle quali contiene due copie del gene ancestrale duplicato (A1, A2 e B1, B2). **(b)** A2 e B2 sono ortologhi di A1. A2 e B2 sono tra loro paraloghi. Fonte: *https://web.archive.org/web/20231108080745/https://biology.stackexchange.com/questions/4962/what-is-the-difference-between-orthologs-paralogs-and-homologs*

Le date d'inserzione stimate con tasso di mutazione neutro sono concordi tra i metodi basati sulla distanza genetica e quelli basati sulla distribuzione ortologa.

Analisi RNA-Seq della famiglia genica AID/APOBEC

L'RNA-Seq (RNA *sequencing*) è una tecnica di sequenziamento di nuova generazione (N*ext-Generation Sequencing*, NGS) che permette di analizzare la presenza e la quantità di RNA cellulare in un preciso momento (Wang, Gerstein & Snyder, 2009). Tale tecnica si basa sulla produzione di una libreria di cDNA a partire da una popolazione di RNA cellulare, generalmente mRNA. Ai frammenti di cDNA sono associati degli adattatori ad una o entrambe le estremità, e poi ogni frammento, con o senza amplificazione tramite PCR (*Polymerase Chain Reaction*), è sequenziato. Le letture di sequenziamento sono successivamente allineate al genoma o ai trascritti di riferimento, oppure assemblati *de novo* per produrre una mappa completa del trascrittoma cellulare (l'insieme di tutto l'RNA di una cellula) in un dato momento temporale (quando è avvenuta l'estrazione dell'RNA), e dunque l'RNA-Seq può essere utilizzato per monitorare e quantificare continuamente il trascrittoma cellulare, osservando come l'espressione cellulare cambia nel tempo e in seguito a stimoli di natura diversa.

I dati di sequenziamento di RNA-Seq sono stati modificati tramite Trimmomatic, un programma di rifilatura (*trimming*), il processo di rimozione delle letture a bassa qualità e delle sequenze degli adattatori di PCR, in modo da garantire un'alta qualità ed affidabilità dei dati. Successivamente le letture sono state mappate sui genomi di riferimento utilizzando il programma STAR (*Spliced Transcripts Alignment to a Reference*), e le letture mappate sui loci dei geni AID/APOBEC sono state contate usando il programma featureCounts.

Risultati

Identificazione e classificazione dei geni della famiglia AID/APOBEC

L'analisi *in silico* del genoma completo di 160 specie di mammifero e l'estrazione di 1420 sequenze ha rilevato la presenza di una regione omologa condivisa per il dominio Z della famiglia genica *AID/APOBEC*. Tramite una ricostruzione filogenetica i loci omologhi del dominio Z sono stati raggruppati in nove cladi (gruppo di organismi o geni che comprende tutti i discendenti di un antenato comune e l'antenato stesso), sette di cui rappresentano lignaggi già conosciuti (*AID*, *A1*, *A2*, *A3Z1*, *A3Z2*, *A3Z3*, and *A4*) e due lignaggi non caratterizzati in precedenza (*UA1* e *UA2*). *UA1* è unico per i mammiferi Euteri (Afrotherians e Xenarthrans), mentre *UA2* è presente unicamente nei marsupiali. Inoltre, sia *UA1* che *UA2* possiedono le sequenze per i motivi catalitici HxE e PCxxC presenti nelle proteine AID/APOBEC e dei segni di selezione purificante. La selezione purificante (o negativa) è un processo che elimina dall'insieme dei geni (*pool* genico) le varianti alleliche con un effetto negativo sulla fitness di un individuo (la capacità di produrre prole fertile), ed è spesso correlata al mantenimento della funzionalità di un gene e perciò frequente nella porzioni codificanti di questi.

157 *AID*, 166 *A1*, 157 *A2*, 266 *A3Z1*, 362 *A3Z2*, 146 *A3Z3*, 153 *A4*, 9 *UA1*, e 4 *UA2* geni sono stati identificati nelle 160 specie analizzate, di cui *A3Z1* e *A3Z2* sono notevolmente amplificati nei Perissodattili, Chirotteri, Primati ed Afroteri, mentre *A3Z3* nei carnivori. Alcune sequenze, ed in particolare quelle dei geni *A3*, sono pseudogenizzate, cioè mostrano una somiglianza con i geni *A3* ma non hanno alcuna funzione, spesso a causa della mancanza della regione promotoriale o di regolazione della traduzione nella sequenza del gene. Inoltre, il numero dei domini Z in *A3* è variabile tra specie diverse, ed i geni *A3* non sono stati rilevati nei marsupiali e monotremi. Infine, *A3Z1* è assente nella maggior parte dei roditori, mentre *A3Z3* è assente negli Strepsirrini e Microchirotteri.

I geni *A3* sono sotto forti pressioni evolutive

La storia evolutiva dei geni *A3* nei mammiferi è stata analizzata tramite un approccio di genetica comparativa. L'entropia di Shannon (o conservazione posizionale), di cui già accennato in precedenza, per i geni *A3Z1*, *A3Z2* e *A3Z3* tende ad essere molto più alta rispetto agli altri geni della famiglia *AID/APOBEC*, indice di una forte selezione diversificate. Confrontando i geni umani *A3A*, *A3C* e *A3H* con quelli ortologhi nei primati (rispettivamente: *A3Z1*, *A3Z2* e *A3Z3*) è stato dimostrato che i siti sotto selezione sono localizzati preferenzialmente in una regione chiamata ansa 7 (*loop* 7), coinvolta nel riconoscimento degli acidi nucleici, localizzata nella porzione superficiale della proteina. Analizzando i loci *A3* amplificati è stato rilevato che la maggior parte dei geni *A3* sono codificati nel loro locus canonico, fiancheggiati dai geni *CBX6* e *CBX7* (i geni normalmente presenti intorno *A3*) ad indicare che l'amplificazione di questi è avvenuta probabilmente tramite diverse duplicazioni in tandem. Tuttavia, tre specie di primati (*Saimiri boliviensis*, *Aotus nancymaae* e *Otolemur garnettii*) mostrano un numero maggiore di loci *A3* al di fuori del locus canonico rispetto che in questo (**Figura 3**), esibendo inoltre un doppio dominio (*A3Z2-A3Z1*) e sequenze prive di introni, presumibilmente originati tramite retrotrasposizione di mRNA modificato per splicing, l'evento molecolare attraverso cui sono rimosse le sequenze introniche del trascritto e

gli esoni sono uniti insieme. La maggior parte di questi geni sono pseudogenizzati, ma alcuni mantengono delle ORFs (O*pen Reading Frames*) relativamente lunghe, ed uno di questi in particolare (nominato "outside #3", presente in *A. nancymaae*) mantiene ancora una ORF completamente intatta. Ulteriori analisi tramite RNA-Seq hanno dimostrato come l'mRNA al di fuori del numero 3 è attivamente espresso in una vasta gamma di tessuti (midollo osseo, milza, linfonodi, ecc.) di *A. nancymaae*, indicando come probabilmente sia ancora funzionale.

Gli ERV evidenziano un conflitto di lunga data tra retrovirus ed il loro ospite

L'impatto di *A3* sull'attività degli ERV è stato valutato tramite analisi comparative di elementi trasponibili (TE) in 160 genomi di mammifero. La composizione di TE nei genomi dei mammiferi varia rispetto alla proporzione di: trasposoni a DNA, SINEs (*Short Interspersed Nuclear Elements*), LINEs (*Long Interspersed Nuclear Elements*) ed ERV. I trasposoni a DNA si muovono lungo il genoma tramite un intermedio a DNA (TE di tipo II) a singolo o doppio filamento, a differenza dei retrotrasposoni, di cui fanno parte gli ERV, che si muovono tramite un intermedio ad RNA (TE di tipo I). I SINEs sono TE non autonomi e non codificanti lunghi dalle 100 alle 700 paia di basi, incapaci quindi di muoversi indipendentemente nel genoma ma necessitano dell'aiuto di altri TE capaci di codificare per la trasposasi, mentre i LINEs sono retrotrasposoni privi di LTRs.

L'attività dei geni *A3* è stata valutata tramite l'analisi dell'accumulo di mutazioni da G ad A negli ERV ed altri TE. Dato che le proteine A3 inducono selettivamente mutazioni nel filamento positivo del genoma dei retrovirus, l'accumulo di mutazioni da G ad A sul filamento positivo del genoma virale può essere sfruttato per valutare l'attività di A3. Mutazioni da G ad A sono state osservate preferenzialmente negli ERV umani ma non in altri TE umani, ed in particolare gli ERV umani mostrano una tendenza a mutazioni del tipo GG-AG o GA-AA, consistente con la preferenza dei geni *A3G* (da GG ad AG), *A3D*, *A3F* e *A3H* (da GA ad AA). Inoltre alcuni ERV presentano segni di ipermutazione da G ad A, attività riscontrata anche nei linfociti B durante il processo di ipermutazione somatica catalizzata da AID per promuovere la diversificazione degli anticorpi. Infine è stato valutata l'associazione tra l'accumulo di mutazioni da G ad A negli ERV e il numero di domini Z in A3, mostrando una forte correlazione positiva (coefficiente di correlazione di Pearson = 0.69, $P < 1.0^{-15}$), ad indicare che un numero minore di geni *A3* è correlato positivamente con un minor accumulo di mutazioni, mentre un numero maggiore di geni *A3* è correlato con accumulo maggiore di mutazioni. Nonostante ciò, ci sono delle eccezioni nella famiglia dei Muridi e in altre due specie: riccio (*Erinaceus europaeus*) e opossum (*Monodelphis domestica*). Queste specie presentano un alto numero di ERV ma relativamente pochi o quasi nessun gene *A3*, e ciò probabilmente è correlato al basso numero di mutazioni negli ERV di queste specie. Inoltre la maggior parte di questi ERV sono relativamente giovani, cioè derivano da eventi di colonizzazione recenti e perciò soggetti all'attività di *A3* per un tempo minore rispetto a quelli delle altre specie.

La radiazione dei geni *A3* è correlata positivamente con l'attività degli ERV

Per investigare la correlazione tra l'espansione della famiglia genica *A3* e l'attività degli ERV gli autori si sono concentrati sui primati perché la loro storia evolutiva è stata studiata nel dettaglio ed è ben caratterizzata.

L’età degli ERV (data di inserzione nel genoma) per ogni specie di primate analizzato è stata valutata tramite un metodo sulla distanza genomica, dimostrando che gli ERV si sono integrati nell’antenato comune dei Simiiformi (Hominoidea, scimmie del vecchio e nuovo mondo) circa 50 milioni di anni fa (**Figura 2**). Viceversa, gli antenati delle Prosimiae (Lemuri, Lorisiformi e Tarsidi) non sono stati infettati in questo periodo. Inoltre, i Simiiformi presentano un numero maggiore di geni *A3* rispetto alle Prosimiae (ad eccezione di *Otolemur garnettii*), a dimostrare come l’amplificazione genica di *A3* è avvenuta presto durante la divergenza delle scimmie, ed i primati Simiiformi presentano il gene *A3G* con un doppio dominio (A3Z2-A3Z1) a differenza delle Prosimiae, ad indicare come la nascita del doppio dominio di *A3G* sia avvenuta anch’essa in questo periodo.

Discussione

I retrovirus endogeni contribuiscono attivamente all'evoluzione dei mammiferi. I retrovirus integrando il proprio genoma in quello dell'ospite hanno permesso l'acquisizione di nuove funzioni cellulari. I geni della sincitina di origine virale sono espressi nei mammiferi durante il processo di formazione della placenta, permettendo la separazione del feto in via di formazione dal sistema immunitario della madre potenzialmente letale. Oltre a conferire nuove funzionalità, la presenza di DNA virale nel genoma cellulare permette di ricostruire la storia evolutiva di questi virus, ma anche di analizzare come l'azione ecologica dei virus agisca da forza selettiva per l'evoluzione del sistema immunitario animale.

Le proteine delle famiglia genica *APOBEC3* (*A3*) agiscono da fattori di restrizione virale per mutazione indotta del DNA dei virus. La presenza dei geni *A3* è correlata positivamente all'accumulo di mutazioni nei genomi virali, come dimostrato dai segni di mutazione indotta da A3 presenti negli ERV, ed inoltre, il numero di geni *A3* è anch'esso correlato con il tasso di mutazione degli ERV, dove un numero maggiore di geni corrisponde ad un maggior numero di mutazioni nel DNA virale. L'analisi di sequenza dei geni ha dimostrato come questi siano andati incontro a selezione diversificante lungo il corso dell'evoluzione, consistente con la capacità di riconoscere un numero maggiore di bersagli virali, favorendo quindi la probabilità di sopravvivenza ed aumentando la fitness generale. La specificità di sequenza delle proteine A3 per i substrati virali sembra essere determinata dall'ansa 7, regione con un alto tasso di selezione diversificante, ad indicare come i diversi eventi di infezioni virale abbiano stimolato l'evoluzione di questa porzione. Inoltre, tale regione è bersaglio di diverse proteine virali (Vif, herpesvirus ribonucleotide reduttasi, proteine antagonista del virus di Epstein–Barr e degli herpesvirus associati al sarcoma di Kaposi), a dimostrare che anche specie differenti dai retrovirus possono stimolare la selezione dell'ansa 7.

Le proteine A3 inducono mutazioni nel genoma virale, ma l'espressione incontrollata di queste proteine può danneggiare le cellule: l'espressione esogena di A3A in cellule in coltura ha un effetto citotossico, così come l'espressione aberrante di A3B e A3H in cellule umane può contribuire allo sviluppo tumorale per mutazione somatica (da G ad A) del genoma umano. La capacità di restrizione virale delle proteine A3 dipende dalla loro attività mutagena (da G ad A) verso il DNA dei virus. Tuttavia, questa attività non è misurabile direttamente, a causa della difficoltà tecnica nel valutare l'effetto delle proteine A3 utilizzando solo informazioni genomiche. Inoltre, il numero di geni *A3* è stato calcolato tramite l'analisi di diverse sequenze, molte delle quali presentano un basso livello di risoluzione, e quindi possibilmente sottostimando il numero di questi geni.

Bibliografia

1. Del Amparo, R., Branco, C., Arenas, J., Vicens, A. & Arenas, M. (2021) Analysis of selection in protein-coding sequences accounting for common biases. *Briefings in Bioinformatics*. 22 (5), bbaa431. doi:10.1093/bib/bbaa431.

2. Durnaoglu, S., Lee, S.-K. & Ahnn, J. (2021) Human Endogenous Retroviruses as Gene Expression Regulators: Insights from Animal Models into Human Diseases. *Molecules and Cells*. 44 (12), 861–878. doi:10.14348/molcells.2021.5016.

3. Eickbush, T.H. & Malik, H.S. (2007) Origins and Evolution of Retrotransposons. In: *Mobile DNA II*. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 1111–1144. doi:10.1128/9781555817954.ch49.

4. Johnson, W.E. (2019) Origins and evolutionary consequences of ancient endogenous retroviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 17 (6), 355–370. doi:10.1038/s41579-019-0189-2.

5. Kaján, G.L., Doszpoly, A., Tarján, Z.L., Vidovszky, M.Z. & Papp, T. (2020) Virus–Host Coevolution with a Focus on Animal and Human DNA Viruses. *Journal of Molecular Evolution*. 88 (1), 41–56. doi:10.1007/s00239-019-09913-4.

6. Modenini, G., Abondio, P. & Boattini, A. (2022) The coevolution between APOBEC3 and retrotransposons in primates. *Mobile DNA*. 13 (1), 27. doi:10.1186/s13100-022-00283-1.

7. Salter, J.D., Bennett, R.P. & Smith, H.C. (2016) The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends in Biochemical Sciences*. 41 (7), 578–594. doi:10.1016/j.tibs.2016.05.001.

8. Valdar, W.S.J. (2002) Scoring residue conservation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 48 (2), 227–241. doi:10.1002/prot.10146.

9. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 10 (1), 57–63. doi:10.1038/nrg2484.

10. Weiss, R.A. (2006) The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*. 3 (1), 67. doi:10.1186/1742-4690-3-67.

Retroviruses drive the rapid evolution of mammalian *APOBEC3* genes

Jumpei Ito[a], Robert J. Gifford[b], and Kei Sato[a,c,1]

[a]Division of Systems Virology, Department of Infectious Disease Control, International Research Center for Infectious Diseases, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 1088639, Japan; [b]Medical Research Council–University of Glasgow Centre for Virus Research, University of Glasgow, Glasgow G61 1QH, United Kingdom; and [c]Core Research for Evolutionary Medical Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency, Saitama 3220012, Japan

Edited by John M. Coffin, Tufts University, Boston, MA, and approved November 12, 2019 (received for review August 15, 2019)

***APOBEC3* (*A3*) genes are members of the *AID/APOBEC* gene family that are found exclusively in mammals. *A3* genes encode antiviral proteins that restrict the replication of retroviruses by inducing G-to-A mutations in their genomes and have undergone extensive amplification and diversification during mammalian evolution. Endogenous retroviruses (ERVs) are sequences derived from ancient retroviruses that are widespread mammalian genomes. In this study we characterize the *A3* repertoire and use the ERV fossil record to explore the long-term history of coevolutionary interaction between A3s and retroviruses. We examine the genomes of 160 mammalian species and identify 1,420 *AID/APOBEC*-related genes, including representatives of previously uncharacterized lineages. We show that *A3* genes have been amplified in mammals and that amplification is positively correlated with the extent of germline colonization by ERVs. Moreover, we demonstrate that the signatures of A3-mediated mutation can be detected in ERVs found throughout mammalian genomes and show that in mammalian species with expanded *A3* repertoires, ERVs are significantly enriched for G-to-A mutations. Finally, we show that *A3* amplification occurred concurrently with prominent ERV invasions in primates. Our findings establish that conflict with retroviruses is a major driving force for the rapid evolution of mammalian *A3* genes.**

mammal | APOBEC3 | gene amplification | endogenous retrovirus | evolutionary arms race

Activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like (AID/APOBEC) superfamily proteins are cellular cytosine deaminases that catalyze cytosine-to-uracil (C-to-U) mutations. AID/APOBEC family proteins contain a conserved zinc-dependent catalytic domain (Z domain) with the HxE/PCxxC motif and are closely associated with important phenomena found in vertebrates such as immunity, malignancy, metabolism, and infectious diseases (reviewed in refs. 1 and 2). For instance, AID induces somatic hypermutation in B cells and promotes antibody diversification (2), and APOBEC1 (A1) regulates lipid metabolism by enzymatically editing the mRNA of apolipoprotein B gene (3). The physiological roles of APOBEC2 (A2) and APOBEC4 (A4) remain unknown, but *APOBEC3* (*A3*) genes are known to encode antiviral factors that restrict the replication of retroviruses (4) and other viruses (5–7).

While most *AID/APOBEC* family genes are conserved in vertebrates, *A3* genes are specific to placental mammals (1). Furthermore, whereas *AID*, *A1*, *A2*, and *A4* genes are singly encoded in each vertebrate including mammals, dramatic expansion of the *A3* repertoire occurred in many mammalian lineages, including primates (8). *A3* genes are grouped into 3 classes (*A3Z1*, *A3Z2*, and *A3Z3*) on the basis of their conserved Z domain sequences (4, 8, 9). For example, human *A3* genes are composed of 7 paralogs (*A3A*, *A3B*, *A3C*, *A3D*, *A3F*, *A3G*, and *A3H*). Of these, *A3A*, *A3C*, and *A3H* (which in other mammals are referred to as *A3Z1*, *A3Z2*, and *A3Z3*, respectively) contain a single Z domain, while the other 4 genes harbor double Z domains: *A3Z2-A3Z1* for *A3B* and *A3G* and *A3Z2-A3Z2* for *A3D* and *A3F* (8, 9).

The conflict between human A3G protein and HIV type 1 (HIV-1) has been studied particularly intensively. Human A3G proteins are incorporated into HIV-1 particles and enzymatically induce C-to-U mutations in viral cDNA, causing guanine-to-adenine (G-to-A) mutations in the viral genome (10, 11). A3G-mediated mutations lead to the accumulation of lethal mutations and ultimately abolish viral replication. On the other hand, an HIV-1–encoding protein, viral infectivity factor (Vif), counteracts this antiviral action by degrading A3G in a ubiquitin-proteasome–dependent manner (4). Such conflicts between A3 proteins and modern viruses (particularly retroviruses) have been reported in a broad range of mammalian species and viruses infecting them (reviewed in ref. 9), and consistent with this, *A3* genes contain strong signatures of diversifying selection (12–14).

Endogenous retroviruses (ERVs) are retrotransposon lineages that are thought to have originated from ancient exogenous retroviruses via infection of germline cells (15, 16). ERVs occupy a substantial fraction of mammalian genomes, demonstrating extensive germline invasion by retroviruses. To combat ERVs and other intragenomic parasites, mammals have developed defense systems such as Krüppel-associated box domain-containing (KRAB) zinc finger proteins (17) and PIWI-interacting RNAs (18). A3 proteins have been shown to suppress the replication of reconstructed ERVs in cell cultures (15, 19) and in a transgenic mouse model (20). Furthermore, previous studies identified the signature of A3-mediated G-to-A mutations in ERVs indicating that ancient retroviruses experience attacks by A3 proteins (15, 16, 19, 21). In this study, we examine the history of evolutionary

Significance

It is thought that evolution of antiviral genes has been shaped over the long term by antagonistic interactions with viruses, but in most cases this is challenging to investigate. In this study we examine the evolution of *A3* genes—antiviral genes that target retroviruses by inducing mutations in their genomes. We demonstrate that ancient, fossilized retrovirus sequences in mammalian genomes contain clear signatures of A3-mediated mutation and provide several additional lines of evidence that *A3* evolution has been driven by long-running conflicts with ancient retroviruses.

Author contributions: J.I., R.J.G., and K.S. designed research; J.I. and R.J.G. performed research; R.J.G. contributed new reagents/analytic tools; J.I. analyzed data; and J.I., R.J.G., and K.S. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: The data, associated protocols, code, and materials in this study are available at https://giffordlabcvr.github.io/A3-Evolution/.

[1]To whom correspondence may be addressed. Email: ksato@ims.u-tokyo.ac.jp.

This article contains supporting information online at https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1914183116/-/DCSupplemental.

First published December 16, 2019.

interaction between ERVs and *A3* genes via genomic analysis of 160 mammalian species.

Results

Identification and Classification of Mammalian *AID/APOBEC* Family Genes. We screened whole genome sequence (WGS) data of 160 mammalian species in silico and extracted 1,420 sequences disclosing homology to the conserved Z domains of *AID/APOBEC* family genes (8) (*SI Appendix*, Fig. S1 and Datasets S1–S3). Phylogenetic reconstructions revealed that these Z domain loci group into 9 clades, 7 of which represent the canonical *AID/APOBEC* lineages (*AID*, *A1*, *A2*, *A3Z1*, *A3Z2*, *A3Z3*, and *A4*) (Fig. 1 *A* and *B*). We also identified additional, previously uncharacterized lineages, designated *UA1* and *UA2* (Fig. 1 *A* and *B*). *UA1* genes were only found in basal eutherian mammal groups: afrotherians (elephants, tenrecs, and sea cows) and xenarthrans (armadillos). *UA2* genes were only found in marsupials (infraclass Marsupialia) (Fig. 1*C*). These phylogenetic relationships were supported by multiple methods (Fig. 1*A* and *SI Appendix*, Fig. S2*A*). In addition, HxE and PCxxC motifs corresponding to the canonical catalytic domain of AID/APOBEC proteins were found in *UA1* and *UA2* gene sequences (*SI Appendix*, Fig. S2*B*). The *UA1* and *UA2* genes contain signatures of purifying selection (*SI Appendix*, Fig. S2*C*) indicating they are protein-coding members of the *AID/APOBEC* family. Indeed, the *UA2* gene in opossum (*Monodelphis domestica*) was annotated as *APOBEC5* in a previous study (22).

As summarized in Fig. 1*B*, we detected 157 *AID*, 166 *A1*, 157 *A2*, 266 *A3Z1*, 362 *A3Z2*, 146 *A3Z3*, 153 *A4*, 9 *UA1*, and 4 *UA2* genes in 160 species of mammalian genomes. Interestingly, *A3Z1* and *A3Z2* genes were highly amplified, while the other family genes were not (Fig. 1 *B* and *C*). We also found that some sequences, particularly those of *A3* genes, were pseudogenized (Fig. 1*B*). The numbers of *A3* Z domains were different among species. In particular, *A3Z1* and *A3Z2* genes in Perissodactyla, Chiroptera, Primates, and Afrotheria were highly amplified (Fig. 1*C* and *SI Appendix*, Fig. S3). Consistent with previous reports (12, 23, 24), canonical *A3* genes were not detected in marsupials or monotremes (order Monotremata). Furthermore, *A3Z1* was commonly absent in Rodentia, while *A3Z3* was absent in Strepsirrhini and Microchiroptera. Amplification of *A3Z3* genes was not detected in any mammalian groups except for Carnivora (carnivores), in which duplicated *A3Z3* genes were almost entirely pseudogenized (*SI Appendix*, Fig. S4).

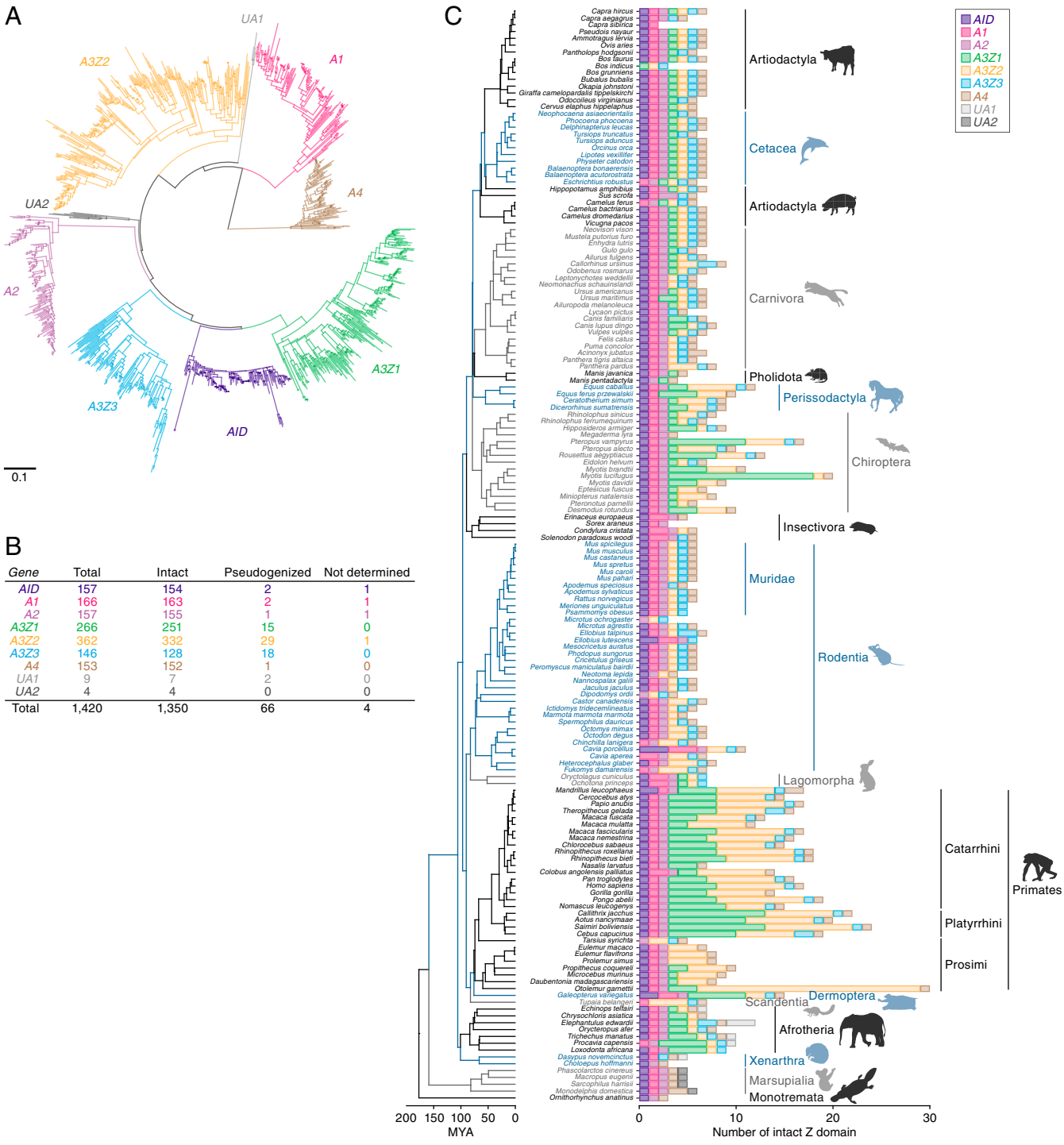
Evolution of Mammalian *A3* Genes Under Strong Selection Pressures. We used comparative genomic approaches to investigate the evolutionary history of mammalian *A3* genes. As shown in Fig. 2*A*, the positional conservation (Shannon entropy) scores in *A3Z1*, *A3Z2*, and *A3Z3* genes tended to be much higher than those found in other *AID/APOBEC* family genes, indicating strong diversifying selection. We detected codon sites evolving under diversifying selection by calculating dN/dS ratios using the branch-site model (25). Although the catalytic domains, which are composed of HxE and PCxxC motifs (1, 2, 4), were highly conserved among the 7 AID/APOBEC family proteins, we detected the signature of diversifying selection at numerous sites (Fig. 2*B*). Comparisons to human A3A (A3Z1 ortholog in primates) (26), A3C (A3Z2 ortholog in primates) (27), and A3H (A3Z3 ortholog in primates) (28) revealed that these sites are preferentially detected in a structural region called loop 7, which recognizes substrate nucleic acids (Fig. 2*B*). Furthermore, most of the sites under diversifying selection are located on the protein surface (Fig. 2*B*).

Investigation of amplified *A3* loci revealed that the majority of *A3* genes are encoded in the canonical *A3* genomic locus (8, 9), flanked by the *CBX6* and *CBX7* genes (Fig. 3*A* and Dataset S4), indicating that amplification of *A3* genes has mainly occurred via tandem gene duplication. However, there are exceptions to this rule: 3 primate species, *Saimiri boliviensis*, *Aotus nancymaae*, and *Otolemur garnettii*, were found to encode more *A3* loci outside the canonical locus than within it (Fig. 3*B*). The *A3* genes in these 3 primates were mostly encoded at entirely distinct loci (Fig. 3*C*) and exhibit double-domain (*A3Z2–A3Z1*) and intronless structures (*SI Appendix*, Fig. S5*A* and Dataset S5) indicating they likely originated via retrotransposition of spliced mRNA (29). These retrotransposed *A3* genes in New World monkeys were more closely related to the human *A3G* gene than the other double-domain *A3* genes in humans (*SI Appendix*, Fig. S5*B*). Although most were pseudogenized (Fig. 3*D*), some retain relatively long ORFs (*SI Appendix*, Fig. S5*C*). In particular, 1 of the retrotransposed *A3* genes in *A. nancymaae* (referred to as "outside #3") retains a full-length ORF (*SI Appendix*, Fig. S5*C*). Indeed, this gene is annotated in the Ensembl gene database (http://www.ensembl.org; Release 97; ENSANAG00000031271). Moreover, analysis of public RNA-sequencing (RNA-Seq) data revealed that mRNA of outside #3 is expressed in a broad range of tissues in *A. nancymaae* (*SI Appendix*, Fig. S5*D*). Taken together, these data show that *A3G*-like genes have been amplified via retrotransposition in New World monkeys, and some of these amplified genes are likely functional.

ERVs Evidence a Long-Running Conflict Between Retroviruses and A3 Genes. To explore the impact of A3 activity on ERVs and their ancient exogenous ancestors, we performed comparative analysis of transposable elements (TEs) in 160 mammalian genomes. As shown in Fig. 4*A* and *SI Appendix*, Fig. S6, the TE composition of mammalian species varies with respect to the proportions of DNA transposons, SINEs, LINEs, and ERVs. To investigate the accumulation level of G-to-A mutations in ERVs, we measured the strand bias of the G-to-A mutation rate in ERVs and other TEs. Since A3 proteins selectively induce G-to-A mutations on the positive strand of retroviruses, strand bias can be an indicator of A3 attack on retroviruses. Consistent with previous reports (30–32), preferential accumulation of G-to-A mutations was observed in human ERVs but not in other human TEs (Fig. 4*B*). We next classified mutation patterns based on the dinucleotide context. As shown in Fig. 4*C*, ERVs in the human genome preferentially exhibited GG-to-AG or GA-to-AA mutations, consistent with the reported preferences of human A3G (GG-to-AG) and A3D, A3F, and A3H (GA-to-AA mutations) (10, 33–39). Additionally, some ERVs exhibited G-to-A hypermutation (Fig. 4*D*).

To explore the potential impact of *A3* gene amplification on ERVs, we first assessed the accumulation level of G-to-A mutations across all mammalian ERVs (*SI Appendix*, Fig. S7), then examined the association between 1) accumulation of G-to-A mutations in ERVs and 2) the number of *A3* Z domains. This revealed a strong positive correlation (Fig. 4*E*) (Pearson's correlation coefficient = 0.69, $P < 1.0E-15$) wherein the possession of fewer *A3* genes (e.g., nonplacental mammals and rodents) is associated with lower accumulation levels, and a higher number of *A3* genes (e.g., simiiformes and some chiropterans) is associated with higher accumulation levels.

Correlation of *A3* Gene Amplification and Diversification with ERV Activity. We examined the association between ERV invasions and *A3* gene family expansion. As shown in Fig. 5 *A* and *B*, we found that the number of *A3* Z domains was positively associated with the percentage of ERVs in mammalian genome (in Poisson regression, coefficient = 0.14, $P < 1.0E-15$). Thus, species in which a greater proportion of the genome is composed of ERVs tend to have a higher number of *A3* genes. Exceptions occur in the rodent family Muridae, as well as in 2 other species, hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and opossum (*M. domestica*). In all of these outlier species, a large proportion of the genome is composed of ERV sequences, but relatively few or no *A3* genes appear to be present (*SI Appendix*, Fig. S8*A*). As might be



Gene	Total	Intact	Pseudogenized	Not determined
AID	157	154	2	1
A1	166	163	2	1
A2	157	155	1	1
A3Z1	266	251	15	0
A3Z2	362	332	29	1
A3Z3	146	128	18	0
A4	153	152	1	0
UA1	9	7	2	0
UA2	4	4	0	0
Total	1,420	1,350	66	4

Fig. 1. Distribution and diversity of *AID/APOBEC* Z domains in mammalian genomes. (*A*) A phylogenetic tree of *AID/APOBEC* Z domains identified via in silico screening of 160 mammalian genomes. The tree shown here was based on an alignment of nucleic acid sequences and was reconstructed using the NJ method (63). Scale bar indicates the genetic distance. (*B*) Number of *AID/APOBEC* Z domains. Those labeled "intact" contain no premature stop codons, while the remainder are labeled as "pseudogenized." Z domain sequences that contained unresolved regions were labeled "not determined." (*C*) Number of the intact *AID/APOBEC* Z domains identified in each mammal species. See *SI Appendix*, Fig. S3, for further details. The species tree shown here was derived from the TimeTree database (73).

expected, ERVs in these outlier species exhibited lower accumulation levels of G-to-A mutations overall (Fig. 5*B*). In addition, many of the ERVs identified in these species are relatively young (*SI Appendix*, Fig. S8 *B–D*) indicating that they derive from recent genome colonization events and have been incorporated into the germline without encountering A3-mediated mutation.

To investigate the association of *A3* gene family expansion with ERV activity, we focused on primates because the evolutionary history of primate ERVs has been explored in depth and is relatively well characterized. We assessed the age of ERV invasions in each species using a genomic distance-based method and found that ERVs prominently invaded in the common ancestors of

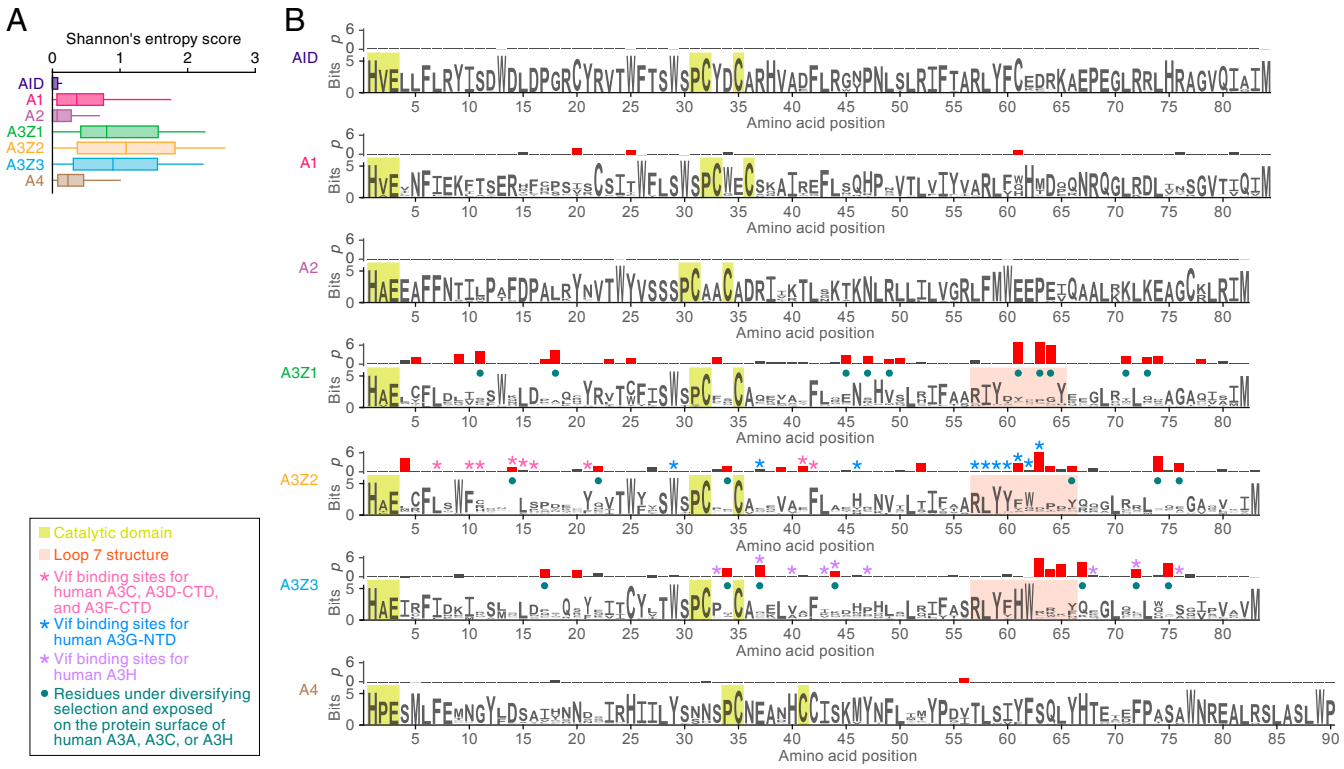


Fig. 2. Evolutionary features of AID/APOBEC Z domains. The analyses are based on the MSAs of respective classes of AID/APOBEC Z domains. The MSAs of intact Z domains of AID ($n = 163$), A1 ($n = 155$), A2 ($n = 251$), A3Z1 ($n = 332$), A3Z2 ($n = 132$), A3Z3 ($n = 152$), and A4 ($n = 154$) (listed in Dataset S3) were used. (*A*) Difference in the sequence conservations among 7 classes of AID/APOBEC Z domains. Positional sequence conservation scores (Shannon's entropy scores) were calculated in respective amino acid sites of the MSA (shown as logo plots in *B*). (*B*) Top rows show the *P* values (−log10) in dN/dS ratio test [with branch-site model (25)] at each codon site. The sites under diversifying selection with statistically significance ($P < 0.05$) are indicated by red bars. Bottom rows show logo plots of the conserved sequences of the AID/APOBEC Z domains. Yellow square indicates the amino acid residues comprising the catalytic domain of AID/APOBEC proteins. Pink square indicates the amino acid residues corresponding to the structure loop 7. The other characteristics on each amino acid residue [e.g., Vif binding sites for human A3C (27), human A3D-CTD (27), human A3F-CTD (27, 74, 75), human A3G-NTD (41, 42), and human A3H (28, 76)] are summarized in the box to the lower left of the panel. CTD, C-terminal domain; NTD, N-terminal domain.

Simiiformes (including Hominoidea, Old World monkeys, and New World monkeys) around 50 million years ago (Fig. 5 *C*, *Left*). In contrast, ancestors of prosimians (including Lemurs, Lorisoids, and Tarsiers) did not experience prominent ERV invasion in this period. Furthermore, simians encoded higher numbers of *A3* genes than prosimians (except for *O. garnettii*), suggesting that *A3* gene amplification occurred early in the divergence of simian species (Fig. 5 *C*, *Middle*).

We investigated the timing of the formation of the double-domain *A3G* gene (i.e., *A3G* gene with *A3Z2-A3Z1* structure) using the Ensembl gene database (www.ensembl.org/). We found that simian primates encoded the double-domain (*A3Z2-A3Z1*) *A3G* gene, whereas prosimians did not, suggesting that the emergence of double-domain *A3G* genes also occurred during this period (Fig. 5 *C*, *Right*). Absence of a double-domain *A3G* gene in prosimians is supported by the finding that no *A3Z2-A3Z1* genetic structures were observed in prosimian genomes (Fig. 3*A*). Overall, the timing of *A3* gene amplification and diversification in primates was highly concordant with the timing of the prominent ERV invasions.

Discussion

Mammalian *A3* family genes possess potent antiviral activities and are thought to have diversified during their evolution to allow targeting of a broader range of viruses (8, 12–14). ERVs provide a rich fossil record for retroviruses, enabling unique insights into the long-term coevolutionary interactions between retroviruses and their hosts. In the present study, we used the ERV fossil record to explore the coevolutionary history of *A3* genes and ERVs.

When examining the ERV fossil record, it is vital to keep in mind that it is necessarily an incomplete record of retrovirus evolution. The vast majority of ERV sequences are fixed in the gene pool of host species, but since 1) fixation of any novel allele is extremely unlikely in the absence of strong selection and 2) most ERV insertions are likely to be selectively neutral at best, it is reasonable to assume that the fixed ERVs we observe in the genomes of contemporary species represent a tiny subset of all of the ERVs that colonized their ancestors genomes. Furthermore, the ERV fossil record is presumably heavily biased toward retrovirus lineages that target germline cells, and there may have been many ancestral retrovirus lineages that never generated germline copies. Nonetheless, the fixed ERVs that are found in contemporary genomes are a unique source of retrospective information about the ancestral interactions between retroviruses and their hosts. Furthermore, because *A3* genes restrict retrovirus replication via DNA editing, ERV sequences can contain genomic signatures that reveal information about their interactions with this particular group of restriction factors.

We show a strong positive correlation between *A3* Z copy number and the extent to which G-to-A mutations have accumulated in ERV sequences (Fig. 4*E*). This finding reinforces the previously proposed concept (15, 16, 19, 21) that the accumulation of G-to-A mutations in ERVs reflects the antiviral activity of A3 proteins. We further show that mammalian species that have accumulated more ERVs (measured as a proportion of their

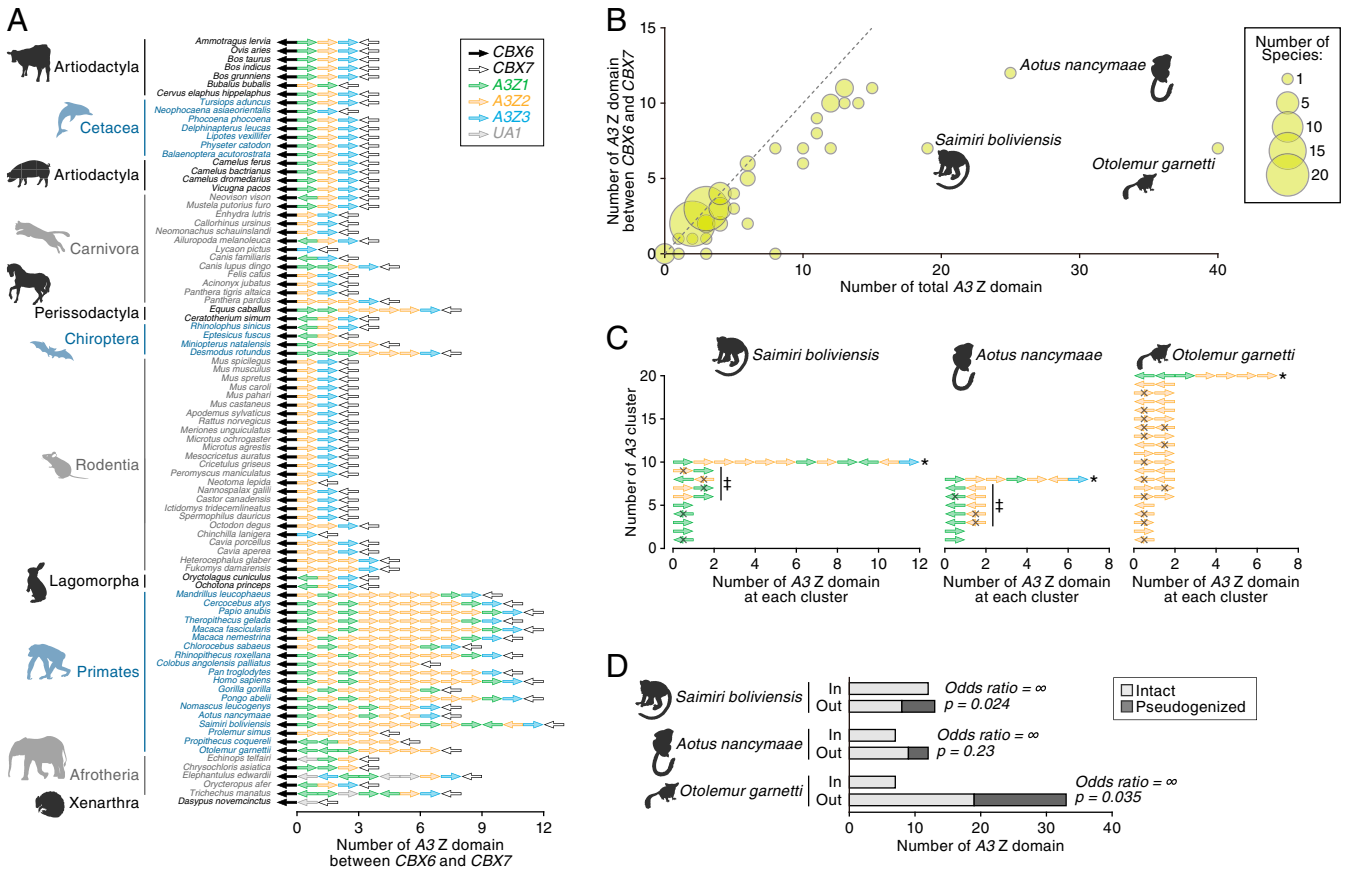


Fig. 3. Genomic location of *A3* genes. (*A*) Genomic order of the *AID/APOBEC* Z domains within the canonical *A3* gene locus, which is sandwiched by *CBX6* and *CBX7* genes. Mammalian genomes in which *CBX6* and *CBX7* genes were detected in the same scaffold were only analyzed. The arrows indicate the direction of respective loci. (*B*) Bubble plot of the number of *A3* Z domains in mammals. The number of the *A3* Z domains in the whole genome (*x* axis) and that within the canonical *A3* gene locus (*y* axis) in each mammal are plotted. Dot size is proportional to the number of species. (*C*) Genomic locations of *A3* Z domains in *S. boliviensis*, *A. nancymaae*, and *O. garnetti*. *A3* Z domains within 100 kb of each other were clustered. An asterisk denotes the *A3* cluster corresponding to the canonical *A3* gene locus. The arrows indicate the direction of respective loci. Pseudogenized sequences are indicated with an X. The sequences indicated by double daggers are intronless sequences and correspond to those described in *SI Appendix*, Fig. S5*A*. (*D*) The association between the genomic location of *A3* genes and pseudogenization. The labels "in" and "out" denote the numbers of *A3* Z domains located inside or outside the canonical *A3* gene locus, respectively. Results for *S. boliviensis*, *A. nancymaae*, and *O. garnetti* are shown. Odds ratio and *P* value, calculated with Fisher's exact test, are shown.

genome) tend to have higher *A3* Z copy numbers (Fig. 5 *A* and *B*). In addition, our analysis revealed that *A3* amplification occurred concurrently with prominent ERV invasions in primates. Overall, our findings provide evidence that the evolution of mammalian *A3* genes has been shaped by a long-running evolutionary conflict with retroviruses, including those retroviruses that have actively invaded mammalian genomes during their evolution, leading to the generation of fixed ERV loci.

The loop 7 region of A3 proteins is thought to determine the sequence specificity of viral nucleotide substrates (40). Our analysis indicates that this region has evolved under strong diversifying selection (Fig. 2*B*), consistent with the idea that rapid evolution in mammalian *A3* genes has been driven by interaction with viruses. Since the genes examined are not orthologous, the variation we observed may reflect diversification that occurred following gene duplication. In addition, it is well established that HIV-1 Vif, an antagonist of A3G activity, specifically binds to loop 7, leading to its degradation (41, 42). This raises the possibility that Vif-like proteins encoded by ancestral retroviruses and/or ERVs may have exerted diversifying selective pressure on A3s. Indeed, remnants of *vif* gene-like ORFs have been identified in endogenous lentiviruses (43–45). In addition, it has recently been reported that herpesviruses encode ribonucleotide reductase large subunits that degrade human A3 proteins (5, 46, 47) and that the A3 antagonists of Epstein–Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus specifically recognize the loop 7 structure of A3B (5). Therefore, A3 antagonists encoded by viruses other than retroviruses may also have exerted selective pressure on the loop 7 structures of *A3* genes.

Most *A3* genes are encoded in the canonical *A3* locus and have been amplified by tandem gene duplication (Fig. 3 *A* and *B*). However, we also detected duplicated *A3* genes outside this region in 3 primate species (*S. boliviensis*, *A. nancymaae*, and *O. garnetti*) (Fig. 3 *B* and *C* and *SI Appendix*, Fig. S5). All of these intronless *A3G*-like genes were amplified by retrotransposition. Furthermore, some are transcribed and may be functional (*SI Appendix*, Fig. S5).

A3 genes have been amplified in multiple lineages of mammals, but in addition, many *A3* genes have been lost or pseudogenized (Fig. 1*C* and *SI Appendix*, Fig. S3). For example, the *A3Z1* gene was lost in Rodentia, and the *A3Z3* gene was lost in Strepsirrhini and Microchiroptera. These findings might be attributed to genotoxic potential of these *A3* genes: uncontrolled *A3* expression can be harmful, and exogenous expression of human A3A (A3Z1 ortholog) in cell cultures triggers cytotoxic effects (48–50). Similarly, the aberrant expression of some human A3 proteins, particularly A3A (51, 52), A3B (A3Z2–A3Z1 ortholog) (51–54), and A3H (A3Z3 ortholog) (55), can contribute to cancer development by inducing somatic G-to-A mutations in the human genome.

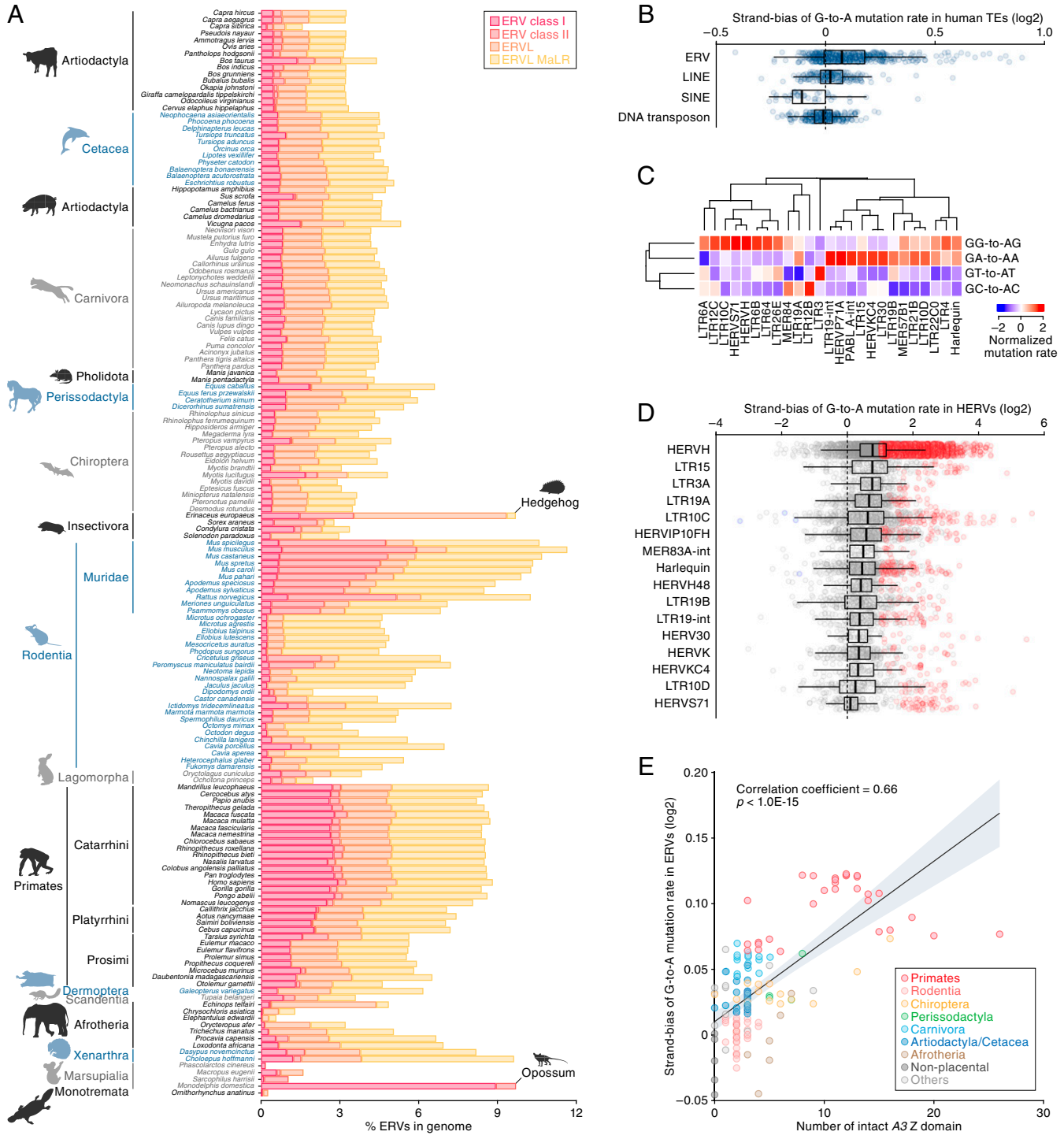


Fig. 4. Signatures of A3 activity in ERV sequences and its association with *A3* amplification. (*A*) Proportions of ERV sequences in the genomes of mammalian species. For proportions of LINE, SINE, and DNA transposon sequences, see *SI Appendix*, Fig. S6. (*B*) Strand bias scores of G-to-A mutation rates in human TEs (log2-transformed). The strand bias score is calculated as the G-to-A mutation rate ratio between the positive and negative strands. Dots indicate the strand bias scores of respective TE groups. (*C*) Dinucleotide sequence composition of G-to-A mutation sites in human ERV subfamilies. Of the top 50 ERV subfamilies with respect to the strand bias score, the top 25 ERV subfamilies with respect to the variation (i.e., coefficient of variation) among the 4 G-to-A mutation sites (GA, GT, GG, and GC) are shown. (*D*) ERV copies presenting the G-to-A hypermutation signature. ERV copies with >1 log2-transformed strand bias score and <0.1 false discovery rate are indicated as red. (*E*) Association of the number of *A3* Z domains with the accumulation level of G-to-A mutations in ERVs in mammals. The *x* axis indicates the number of intact *A3* Z domains, and the *y* axis indicates the mean value of the log2-transformed strand bias scores among ERVs in the genome. Correlation coefficient and *P* value are calculated by Pearson's correlation.

Unlike the *A3Z1* and *A3Z2* genes, *A3Z3* is highly conserved in most mammals and is not amplified in most mammalian lineages. Exceptions occur in carnivores and some other species; however, almost all duplicated *A3Z3* genes identified in these species were pseudogenized (*SI Appendix*, Fig. S4). Moreover, phylogenetic relationships and the pattern of the premature stop codon

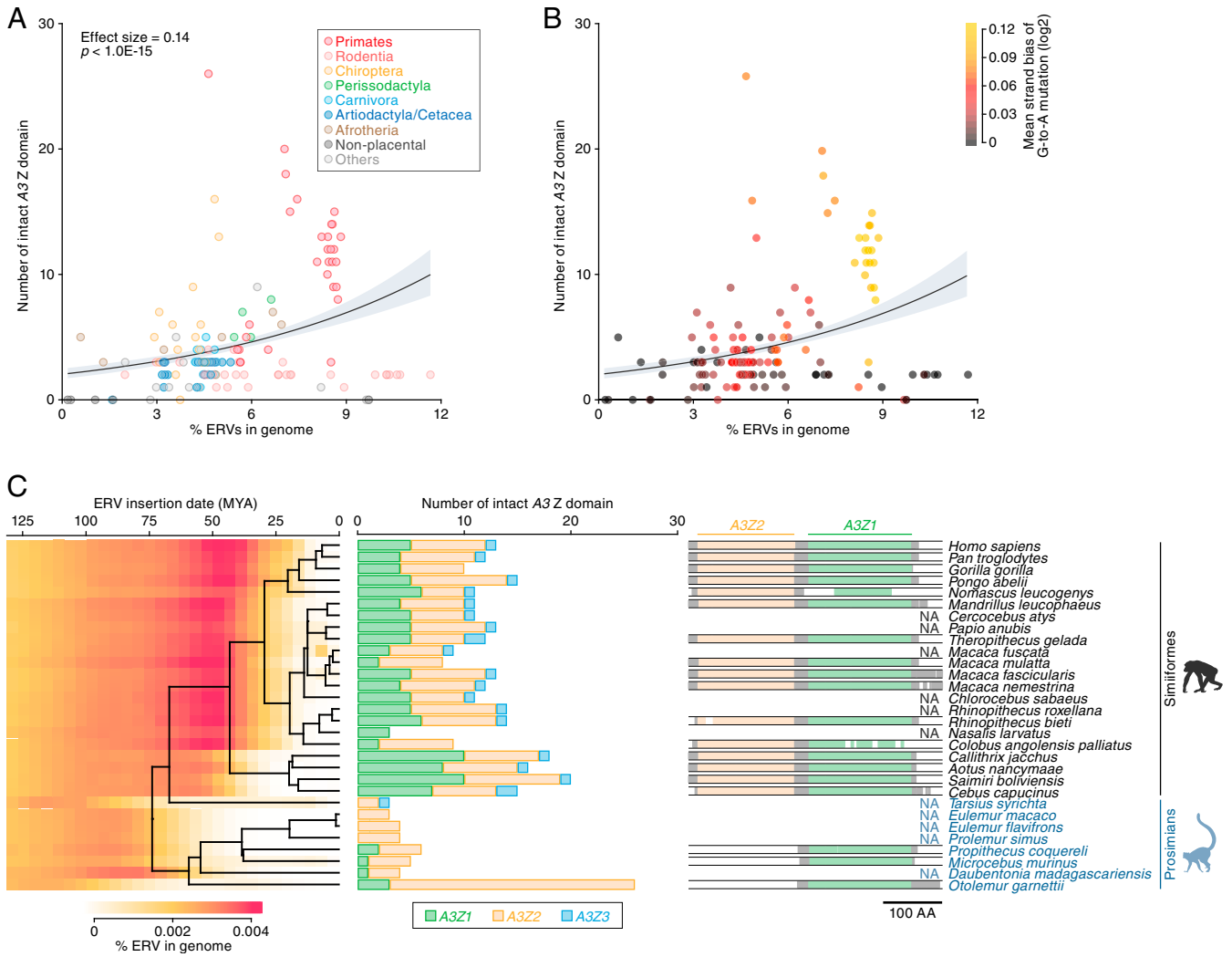


Fig. 5. Association between *A3* gene family expansion and ERV invasion. (*A* and *B*) Association of the number of *A3* Z domains with the amount of ERV insertions in the genome. Dots are colored according to the species taxa (*A*) or the accumulation level of G-to-A mutations in ERVs (*B*). The association was evaluated under the Poisson regression with log link function. (*C*) Temporal association of ERV invasion with *A3* gene amplification in primates. (*Left*) Amount of ERV insertions in each age category in distinct primate species. ERV insertion date was estimated based on the genetic distance of each ERV integrant from the consensus sequence under the molecular clock assumption [2.2×10^{-9} mutations per site per year (68)]. (*Middle*) Number of intact *A3* Z domains. (*Right*) Schematic of the MSA of *A3G* (*A3Z2-Z3Z1* type) gene. Sequences of *A3G* genes in primates recorded in the Ensembl gene database (http://www.ensembl.org) were used. NA, not applicable (no available data).

positions (*SI Appendix*, Fig. S4) indicate that the duplication–pseudogenization events have happened twice independently during carnivore evolution. These observations support that while the *A3Z3* gene is indispensable for the hosts, its duplication might be genotoxic.

A3 proteins can suppress retroviral replication in a G-to-A mutation-independent fashion (e.g., inhibition of reverse transcription) (56–59). We could not address this dimension of ERV–A3 interaction because of the technical difficulty of assessing the mutation-independent effect of A3 proteins on retroviruses using only genomic information. It should also be noted that the number of *A3* genes counted in this study might underestimate the true value because of relatively low resolution of many whole genome sequences. Moreover, we particularly focused on the numbers and sequences of the Z domain of *AID/APOBEC* family genes, and we could not fully address whether 1) some 2 Z domains compose a double domain gene and 2) there are splicing variants. Nevertheless, this is to our knowledge the most comprehensive investigation of *A3* gene evolution performed to date.

Materials and Methods

Sequence Data. WGS assemblies and RNA-Seq data analyzed in this study are summarized in Datasets S1 and S6, respectively. Mammalian TE sequences were obtained using RepeatMasker (version open-4-0-9) (http://repeatmasker.org) with Repbase RepeatMasker libraries (version 20181026) (60). RMBlast was selected as the search engine, and RepeatMasker was run with the options "-q xsmall -a -species <species>" where <species> denotes the species name of the analyzed genome (Dataset S7).

Genome Screening. Similarity search-based screens of sequence databanks were performed using the database-integrated genome-screening (DIGS) tool (61) which provides a relational database framework for performing systematic tBLASTn-based screening of WGS databanks (61). We used AID/APOBEC polypeptide sequences of 5 species (human, mouse, cow, megabat, and cat) as queries for DIGS (*SI Appendix*, Fig. S1 *A*–*C* and Dataset S2). The resultant list of hits (i.e., sequences disclosing homology to *AID/APOBEC* family genes) was filtered to remove short and low-similarity matches (tBLASTn bitscore < 50). In the DIGS hit sequences, a partial sequence region

[referred to as conserved region (8)] of *AID/APOBEC* family genes was extracted and used in downstream analyses (*SI Appendix*, Fig. S1*A*). Because the conserved regions of *AID/APOBEC* family genes are located on a single exon (*SI Appendix*, Fig. S1*C*) the set of loci identified via DIGS could readily be interrogated using phylogenetic approaches. We selected sequences that covered >70% of the conserved region (*SI Appendix*, Fig. S1*D*) and constructed multiple sequence alignments (MSAs) using the L-INS-I algorithm as implemented in MAFFT (version 7.407) (62). A phylogenetic tree was reconstructed using the neighbor-joining (NJ) method (63) as implemented in MEGAX (64). Only alignment sites with the >85% site coverage were used for phylogenetic construction. Additional tree-based filtering of the underlying dataset was performed prior to construction of a final tree: a preliminary tree was constructed, and subsequently, phylogenetic outlier sequences, which have extremely long external branches (i.e., standardized external branch length > 5), were detected and discarded from downstream analyses. The final set of *AID/APOBEC*-related loci is summarized in Dataset S3.

To investigate the genomic context of *AID/APOBEC*-related loci, the polypeptide sequences of genes flanking the canonical *A3* locus (i.e., *CBX6* and *CBX7*) were used as queries for DIGS. Genomic synteny was illustrated using ggplot2 (https://ggplot2.tidyverse.org/) with the R library ggquiver (https://github.com/mitchelloharawild/ggquiver).

Sequence Analysis. In-frame MSAs of nucleotide sequences were constructed using the codon-based alignment algorithm implemented in MUSCLE (65). Codon sites with >50% site coverages were used for downstream analyses. Logo plots of the amino acid sequences were generated using weblogo3 (66). Positional Shannon's entropy score was calculated for amino acid MSAs using tools available via the Los Alamos HIV-1 sequence database website (www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy_one.html). A dN/dS ratio test using the branch-site model as implemented in Hyphy MEME (25) was used to detect codon sites under diversifying selection. The phylogenetic tree for this test was constructed using maximum likelihood method as implemented in MEGAX (64).

Mutation Strand Bias Analysis. To assess the accumulation level of G-to-A mutations in ERVs and other TEs, the strand bias of the G-to-A mutation rate was calculated. First, we calculated the number of nucleotide changes relative to consensus for each TE integrant using the pairwise sequence alignment generated by RepeatMasker. TE integrants with low-confidence alignments (<1,000 Smith–Waterman score) were excluded from the analysis. Next, G-to-A mutation rates in the positive and negative strands of each TE were calculated. Finally, the strand bias score was defined as a ratio of the G-to-A mutation rate between the positive and negative strands (i.e., the mutation rate in the positive strand was divided by the one in the negative strand). The strand bias score was calculated for each TE integrant or each TE group. Statistical significance of the strand bias was evaluated by Fisher's exact test. False discovery rate was calculated according to the Benjamini–Hochberg method (67).

Estimation of Insertion Dates of ERVs. Insertion dates of ERV loci were estimated using both 1) ortholog distribution-based and 2) genetic distance-based methods. Ortholog distribution-based estimation was performed for ERVs in human and mouse genomes. Liftover chain files were downloaded from UCSC genome browser (https://genome.ucsc.edu/) (Dataset S8). The Liftover program (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver) and chain file were used as the basis for attempting to convert the genomic coordinates of ERV integrants in one species genome to those found in another species using the option "minMatch=0.5." If conversion succeeded, we inferred that the orthologous copy of the ERV integrant was likely present in the corresponding genome. In the case of mouse ERVs, we first converted genomic coordinates of ERVs in Mm9 to those in Mm10, which is the latest version of the mouse reference genome. Subsequently, the genomic coordinates in Mm10 converted to those in the genomes of increasingly distantly related species. Insertion dates of ERVs were estimated from the ortholog distributions according to the scheme summarized in *SI Appendix*, Fig. S9.

Genetic distance-based estimation of insertion dates was performed for ERVs by calculating the genetic distance of each ERV integrant from a consensus sequence representing the specific lineage the ERV derived from. The distribution of genetic distances was summarized using the Landscape function implemented in RepeatMasker. Genetic distances were converted to the age estimations under the assumption of a neutral molecular clock. For Primates, Insectivora, and Marsupialia a neutral rate of 2.2×10^{-9} mutations per year per site (68) was used. For Rodents, which experience relatively rapid rates of neutral change (69), a rate of 7.0×10^{-9} mutations per year per site was used. For each of these 2 groups, the estimated insertion dates using these rates were highly concordant between the genetic distance-based and ortholog distribution-based methods (*SI Appendix*, Fig. S9).

RNA-Seq Analysis of *AID/APOBEC* Family Genes. RNA-Seq dataset used in the present study is summarized in Dataset S6. RNA-Seq reads were trimmed by Trimmomatic (version 0.36) (70) and subsequently mapped to the reference genomes using STAR (version 020201) (71). Reads mapped on the identified loci of *AID/APOBEC* family genes were counted using featureCounts (version 1.6.4) (72). Only reads mapped to unique genomic regions were counted. Read counts were normalized to the total number of uniquely mapped reads, and expression levels were measured as fragments per kilobase per million mapped fragments.

Data Availability. The data, associated protocols, code, and materials in this study are available at https://giffordlabcvr.github.io/A3-Evolution/.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Mai Suganami (Division of Systems Virology, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Japan) for technical support and Daniel Sauter (Institute of Molecular Virology, Ulm University Medical Center, Germany) for thoughtful comments and suggestions for the manuscript. The supercomputing resource, SHIROKANE, was provided by Human Genome Center, The Institute of Medical Science, the University of Tokyo, Japan. This study was supported in part by Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) Japanese Initiative for Progress of Research on Infectious Disease for Global Epidemic (J-PRIDE) 19fm0208006h0003 (K.S.); AMED Research Program on HIV/AIDS 19fk0410014h0002 (to K.S.) and 19fk0410019h0002 (to K.S.); Japan Science and Technology Agency CREST (to K.S.); Grants-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) Scientific Research B 18H02662 (to K.S.), Scientific Research on Innovative Areas 16H06429 (to K.S.), 16K21723 (to K.S.), 17H05813 (to K.S.), and 19H04826 (to K.S.), and Fund for the Promotion of Joint International Research (Fostering Joint International Research) 18KK0447 (to K.S.); Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) Research Fellow PD 19J01713 (to J.I.); Takeda Science Foundation (to K.S.); ONO Medical Research Foundation (to K.S.); Ichiro Kanehara Foundation (to K.S.); Lotte Foundation (to K.S.); Joint Usage/Research Center program of Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University (to K.S.); International Joint Research Project of the Institute of Medical Science, the University of Tokyo, 2019-K3003 (to R.J.G. and K.S.); and JSPS Core-to-Core program (A. Advanced Research Networks) (to R.J.G. and K.S.). R.J.G. was supported by a grant from the UK Medical Research Council (MC_UU_12014/10).

1. S. G. Conticello, The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol.* **9**, 229 (2008).
2. S. G. Conticello, M. A. Langlois, Z. Yang, M. S. Neuberger, DNA deamination in immunity: AID in the context of its APOBEC relatives. *Adv. Immunol.* **94**, 37–73 (2007).
3. B. Teng, C. F. Burant, N. O. Davidson, Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* **260**, 1816–1819 (1993).
4. R. S. Harris, J. P. Dudley, APOBECs and virus restriction. *Virology* **479–480**, 131–145 (2015).
5. A. Z. Cheng *et al.*, Epstein-Barr virus BORF2 inhibits cellular APOBEC3B to preserve viral genome integrity. *Nat. Microbiol.* **4**, 78–88 (2019).
6. M. S. Bouzidi *et al.*, APOBEC3DE antagonizes hepatitis B virus restriction factors APOBEC3F and APOBEC3G. *J. Mol. Biol.* **428**, 3514–3528 (2016).
7. J. Köck, H. E. Blum, Hypermutation of hepatitis B virus genomes by APOBEC3G, APOBEC3C and APOBEC3H. *J. Gen. Virol.* **89**, 1184–1191 (2008).
8. R. S. LaRue *et al.*, Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. *J. Virol.* **83**, 494–497 (2009).
9. Y. Nakano *et al.*, A conflict of interest: The evolutionary arms race between mammalian APOBEC3 and lentiviral Vif. *Retrovirology* **14**, 31 (2017).
10. B. Mangeat *et al.*, Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**, 99–103 (2003).
11. A. M. Sheehy, N. C. Gaddis, J. D. Choi, M. H. Malim, Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646–650 (2002).
12. C. Münk, A. Willemsen, I. G. Bravo, An ancient history of gene duplications, fusions and losses in the evolution of APOBEC3 mutators in mammals. *BMC Evol. Biol.* **12**, 71 (2012).
13. N. K. Duggal, H. S. Malik, M. Emerman, The breadth of antiviral activity of Apobec3DE in chimpanzees has been driven by positive selection. *J. Virol.* **85**, 11361–11371 (2011).
14. S. L. Sawyer, M. Emerman, H. S. Malik, Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol.* **2**, E275 (2004).
15. Y. N. Lee, M. H. Malim, P. D. Bieniasz, Hypermutation of an ancient human retrovirus by APOBEC3G. *J. Virol.* **82**, 8762–8770 (2008).
16. P. Jern, J. P. Stoye, J. M. Coffin, Role of APOBEC3 in genetic diversity among endogenous murine leukemia viruses. *PLoS Genet.* **3**, 2014–2022 (2007).
17. G. Ecco, M. Imbeault, D. Trono, KRAB zinc finger proteins. *Development* **144**, 2719–2729 (2017).

18. H. Ishizu, H. Siomi, M. C. Siomi, Biology of PIWI-interacting RNAs: New insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes Dev.* **26**, 2361–2373 (2012).
19. C. Esnault, S. Priet, D. Ribet, O. Heidmann, T. Heidmann, Restriction by APOBEC3 proteins of endogenous retroviruses with an extracellular life cycle: *Ex vivo* effects and *in vivo* "traces" on the murine IAPE and human HERV-K elements. *Retrovirology* **5**, 75 (2008).
20. R. S. Treger *et al*., Human APOBEC3G prevents emergence of infectious endogenous retrovirus in mice. *J. Virol.* **93**, e00728-19 (2019).
21. B. A. Knisbacher, E. Y. Levanon, DNA editing of LTR retrotransposons reveals the impact of APOBECs on vertebrate genomes. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 554–567 (2016).
22. F. Severi, A. Chicca, S. G. Conticello, Analysis of reptilian APOBEC1 suggests that RNA editing may not be its ancestral function. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 1125–1129 (2011).
23. T. Ikeda *et al*., Opossum APOBEC1 is a DNA mutator with retrovirus and retroelement restriction activity. *Sci. Rep.* **7**, 46719 (2017).
24. R. S. LaRue *et al*., The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Mol. Biol.* **9**, 104 (2008).
25. B. Murrell *et al*., Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genet.* **8**, e1002764 (2012).
26. T. Kouno *et al*., Crystal structure of APOBEC3A bound to single-stranded DNA reveals structural basis for cytidine deamination and specificity. *Nat. Commun.* **8**, 15024 (2017).
27. S. Kitamura *et al*., The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1005–1010 (2012).
28. N. M. Shaban *et al*., The antiviral and cancer genomic DNA deaminase APOBEC3H is regulated by an RNA-mediated dimerization mechanism. *Mol. Cell* **69**, 75–86.e9 (2018).
29. P. M. Harrison, D. Zheng, Z. Zhang, N. Carriero, M. Gerstein, Transcribed processed pseudogenes in the human genome: An intermediate form of expressed retrosequence lacking protein-coding ability. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2374–2383 (2005).
30. F. Anwar, M. P. Davenport, D. Ebrahimi, Footprint of APOBEC3 on the genome of human retroelements. *J. Virol.* **87**, 8195–8204 (2013).
31. M. Kinomoto *et al*., All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* **35**, 2955–2964 (2007).
32. A. E. Hulme, H. P. Bogerd, B. R. Cullen, J. V. Moran, Selective inhibition of Alu retrotransposition by APOBEC3G. *Gene* **390**, 199–205 (2007).
33. E. W. Refsland, J. F. Hultquist, R. S. Harris, Endogenous origins of HIV-1 G-to-A hypermutation and restriction in the nonpermissive T cell line CEM2n. *PLoS Pathog.* **8**, e1002800 (2012).
34. P. A. Gourraud *et al*., APOBEC3H haplotypes and HIV-1 pro-viral vif DNA sequence diversity in early untreated human immunodeficiency virus-1 infection. *Hum. Immunol.* **72**, 207–212 (2011).
35. K. N. Bishop *et al*., Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr. Biol.* **14**, 1392–1396 (2004).
36. M. T. Liddament, W. L. Brown, A. J. Schumacher, R. S. Harris, APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr. Biol.* **14**, 1385–1391 (2004).
37. H. L. Wiegand, B. P. Doehle, H. P. Bogerd, B. R. Cullen, A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J.* **23**, 2451–2458 (2004).
38. Y. H. Zheng *et al*., Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* **78**, 6073–6076 (2004).
39. Q. Yu *et al*., Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 435–442 (2004).
40. A. Rathore *et al*., The local dinucleotide preference of APOBEC3G can be altered from 5′-CC to 5′-TC by a single amino acid substitution. *J. Mol. Biol.* **425**, 4442–4454 (2013).
41. T. Kouno *et al*., Structure of the Vif-binding domain of the antiviral enzyme APOBEC3G. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 485–491 (2015).
42. D. Lavens *et al*., Definition of the interacting interfaces of Apobec3G and HIV-1 Vif using MAPPIT mutagenesis analysis. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1902–1912 (2010).
43. T. Hron, H. Farkašová, A. Padhi, J. Pačes, D. Elleder, Life history of the oldest lentivirus: Characterization of ELVgv integrations in the dermopteran genome. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 2659–2669 (2016).
44. G. Z. Han, M. Worobey, Endogenous lentiviral elements in the weasel family (*Mustelidae*). *Mol. Biol. Evol.* **29**, 2905–2908 (2012).
45. R. J. Gifford, Viral evolution in deep time: Lentiviruses and mammals. *Trends Genet.* **28**, 89–100 (2012).
46. A. Z. Cheng *et al*., A conserved mechanism of APOBEC3 relocalization by herpesviral ribonucleotide reductase large subunits. *J. Virol.*, 10.1128/JVI.01539-19 (2019).
47. J. A. Stewart, T. C. Holland, A. S. Bhagwat, Human herpes simplex virus-1 depletes APOBEC3A from nuclei. *Virology* **537**, 104–109 (2019).
48. S. Landry, I. Narvaiza, D. C. Linfesty, M. D. Weitzman, APOBEC3A can activate the DNA damage response and cause cell-cycle arrest. *EMBO Rep.* **12**, 444–450 (2011).
49. R. Suspène *et al*., Somatic hypermutation of human mitochondrial and nuclear DNA by APOBEC3 cytidine deaminases, a pathway for DNA catabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 4858–4863 (2011).
50. A. M. Land *et al*., Endogenous APOBEC3A DNA cytosine deaminase is cytoplasmic and nongenotoxic. *J. Biol. Chem.* **288**, 17253–17260 (2013).
51. S. Nik-Zainal *et al*., Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer. *Nat. Genet.* **46**, 487–491 (2014).
52. B. J. Taylor *et al*., DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis. *eLife* **2**, e00534 (2013).
53. M. B. Burns, N. A. Temiz, R. S. Harris, Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat. Genet.* **45**, 977–983 (2013).
54. M. B. Burns *et al*., APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature* **494**, 366–370 (2013).
55. G. J. Starrett *et al*., The DNA cytosine deaminase APOBEC3H haplotype I likely contributes to breast and lung cancer mutagenesis. *Nat. Commun.* **7**, 12918 (2016).
56. T. Kobayashi *et al*., Quantification of deaminase activity-dependent and -independent restriction of HIV-1 replication mediated by APOBEC3F and APOBEC3G through experimental-mathematical investigation. *J. Virol.* **88**, 5881–5887 (2014).
57. K. N. Bishop, M. Verma, E. Y. Kim, S. M. Wolinsky, M. H. Malim, APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog.* **4**, e1000231 (2008).
58. R. K. Holmes, F. A. Koning, K. N. Bishop, M. H. Malim, APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* **282**, 2587–2595 (2007).
59. K. N. Bishop, R. K. Holmes, M. H. Malim, Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J. Virol.* **80**, 8450–8458 (2006).
60. W. Bao, K. K. Kojima, O. Kohany, Repbase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. *Mob. DNA* **6**, 11 (2015).
61. H. Zhu, T. Dennis, J. Hughes, R. J. Gifford, Database-integrated genome screening (DIGS): Exploring genomes heuristically using sequence similarity search tools and a relational database. https://doi.org/10.1101/246835 (25 April 2018).
62. K. Katoh, D. M. Standley, MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772–780 (2013).
63. N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425 (1987).
64. S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura, MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549 (2018).
65. R. C. Edgar, MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797 (2004).
66. G. E. Crooks, G. Hon, J. M. Chandonia, S. E. Brenner, WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190 (2004).
67. Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* **57**, 289–300 (1995).
68. S. Kumar, S. Subramanian, Mutation rates in mammalian genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 803–808 (2002).
69. M. Bulmer, K. H. Wolfe, P. M. Sharp, Synonymous nucleotide substitution rates in mammalian genes: Implications for the molecular clock and the relationship of mammalian orders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5974–5978 (1991).
70. A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
71. A. Dobin *et al*., STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
72. Y. Liao, G. K. Smyth, W. Shi, featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930 (2014).
73. S. Kumar, G. Stecher, M. Suleski, S. B. Hedges, TimeTree: A resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 1812–1819 (2017).
74. J. S. Albin *et al*., A single amino acid in human APOBEC3F alters susceptibility to HIV-1 Vif. *J. Biol. Chem.* **285**, 40785–40792 (2010).
75. J. L. Smith, V. K. Pathak, Identification of specific determinants of human APOBEC3F, APOBEC3C, and APOBEC3DE and African green monkey APOBEC3F that interact with HIV-1 Vif. *J. Virol.* **84**, 12599–12608 (2010).
76. M. Nakashima *et al*., Mapping region of human restriction factor APOBEC3H critical for interaction with HIV-1 Vif. *J. Mol. Biol.* **429**, 1262–1276 (2017).