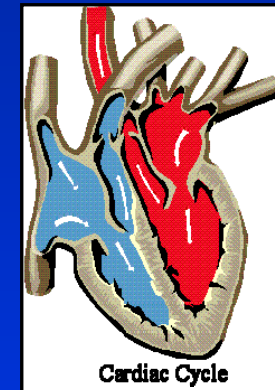
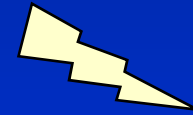
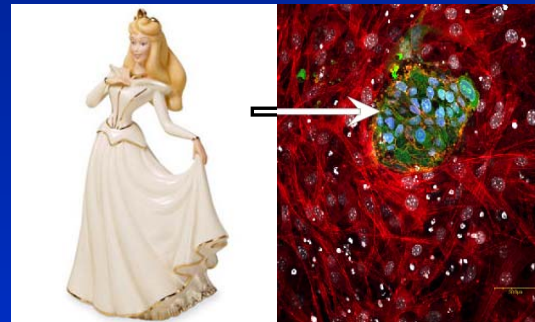
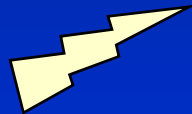
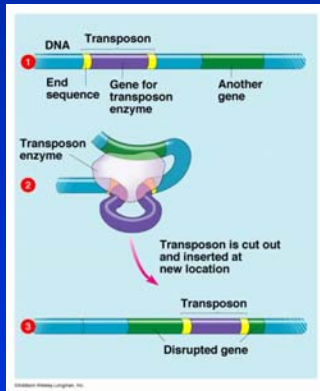


A modern genetika eszköztára, avagy ugráló génekkel a szívizom nyomában



Orbán Tamás

Génreguláció Kutatócsoport



ELKH

Mik is azok a transzpozonok? - 1.

- „ugráló gének” - a mobilis genetikai elemek helyesebb
- Barbara McClintock felfedezése kukoricában
kísérletek: 1940-es és 50-es évek
Nobel-díj: 1983



Ac és Ds elemek

Egy kis nevezéktan

- prokarióta nevezéktan kicsit megtévesztő:



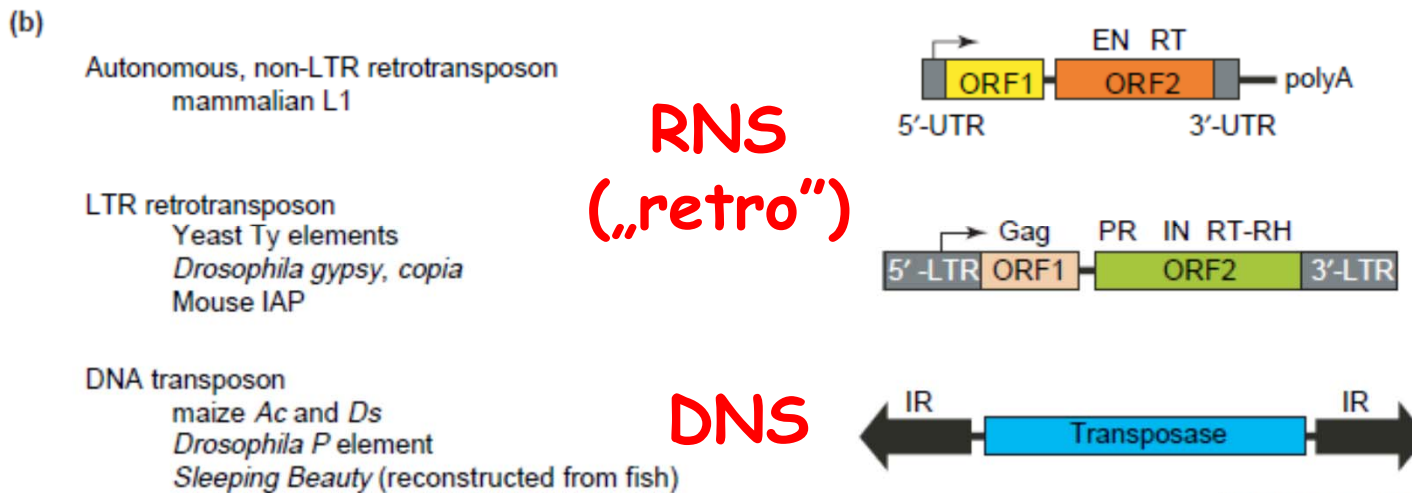
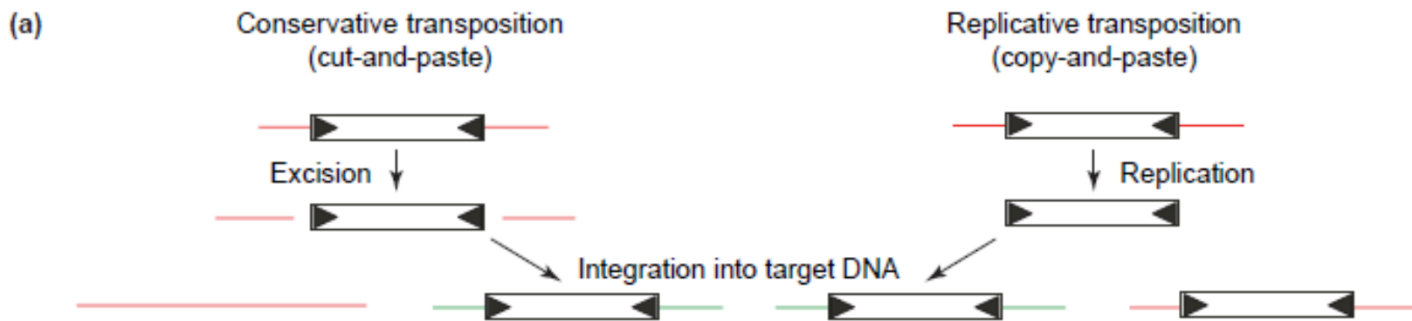
- valójában pontosabb:

transzpozon = mobilis genetikai elem

Mik is azok a transzpozonok? - 2.

- molekuláris paraziták? „önző gének”?
 - csak részben!
- az evolúció fontos mozgatórugói:
 - rezisztencia gének terjesztése (főleg baktériumok)
 - genomi átrendeződések, új gének: „domesztikáció”,
pl. RAG rekombináz, Drosophila telomeráz
 - az emberi genom ~45%-a !!!

Transzpozonok/transzpozíció típusai



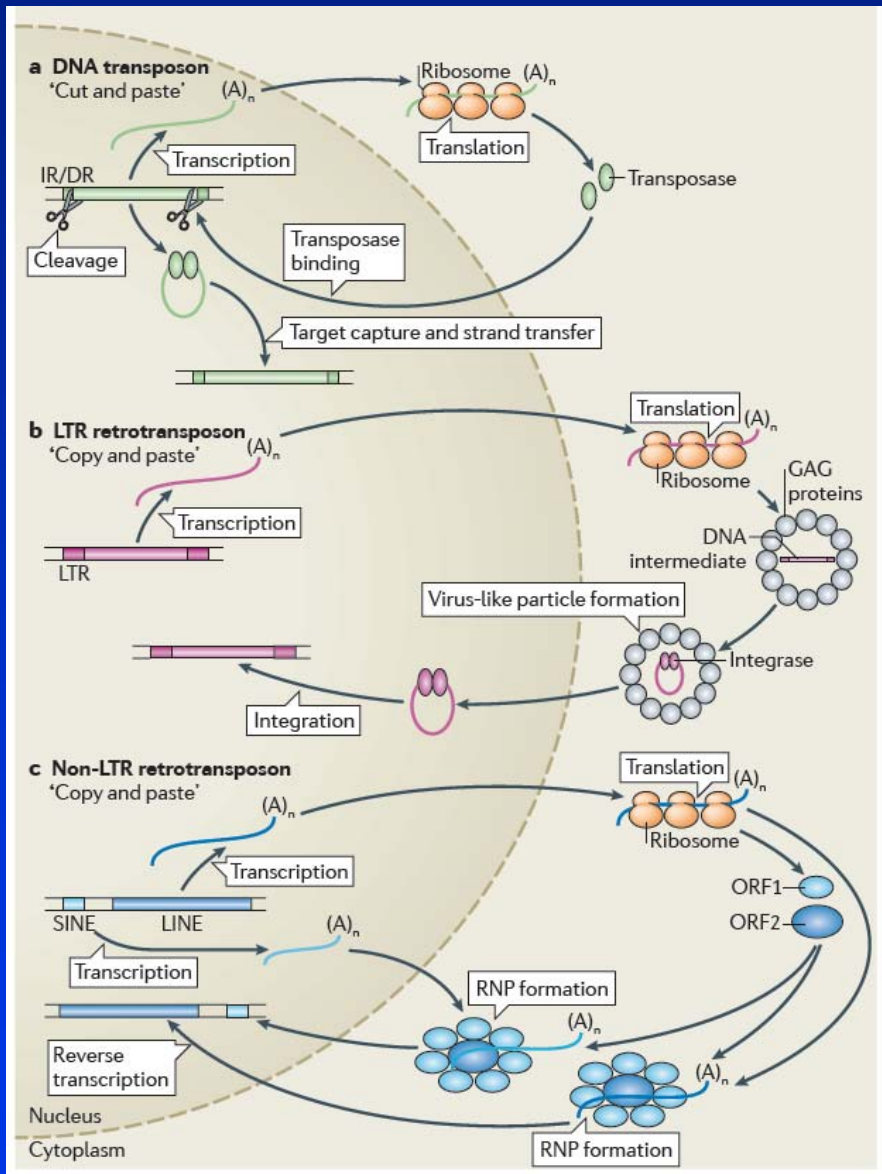
TRENDS in Genetics

Trend Genet, 2005; 21(1):8

Eukarióta mobilis elemek osztályozása

Classification		Structure	TSD	Code	Occurrence
Order	Superfamily				
Class I (retrotransposons)					
LTR	Copia		4-6	RLC	P, M, F, O
	Gypsy		4-6	RLG	P, M, F, O
	Bel-Pao		4-6	RLB	M
	Retrovirus		4-6	RLR	M
	ERV		4-6	RLE	M
DIRS	DIRS		0	RYD	P, M, F, O
	Ngaro		0	RYN	M, F
	VIPER		0	RYV	O
PLE	Penelope		Variable	RPP	P, M, F, O
LINE	R2		Variable	RIR	M
	RTE		Variable	RIT	M
	Jockey		Variable	RIJ	M
	L1		Variable	RIL	P, M, F, O
	I		Variable	RII	P, M, F
SINE	tRNA		Variable	RST	P, M, F
	7SL		Variable	RSL	P, M, F
	5S		Variable	RSS	M, O
Class II (DNA transposons) - Subclass 1					
TIR	Tc1-Mariner		TA	DTT	P, M, F, O
	hAT		8	DTA	P, M, F, O
	Mutator		9-11	DTM	P, M, F, O
	Meritn		8-9	DTE	M, O
	Transib		5	DTR	M, F
	P		8	DTP	P, M
	PiggyBac		TTAA	DTB	M, O
	PIF-Harbinger		3	DTH	P, M, F, O
	CACTA		2-3	DTC	P, M, F
Crypton	Crypton		0	DYC	F
Class II (DNA transposons) - Subclass 2					
Helitron	Helitron		0	DHH	P, M, F
Maverick	Maverick		6	DMM	M, F, O

A transzpozíció néhány mechanizmusa



A(z eukarióta) genom is védekezik, pl.:

- promóter metiláció, kromatin módosítások
- RNS interferencia:
 - endogén siRNS-ek
 - piRNS-ek
 - (- akár bizonyos miRNS-ek is)

Melyik gyakoribb a genomokban?

DNS transzpozonok

vagy a

retrotranszpozonok?

Transzpozonok mindenhol...

Human Genome ~3200 Mb	# of Copies (×1000)	Total Length (Mb)	% of Genome	Active
LINES	868	558.8	20.42	
LINE1 ¹	516	462	16.89	Active
LINE2	315	88.2	3.22	
LINE3	37	8.4	0.31	
SINEs	1558	359.6	13.29	
Alu ¹	1090	290.1	10.6	Active using L1 RT
MIR	393	60.1	2.2	
MIR3	75	9.3	0.34	
SVA ¹	2.76	4.2	0.15	Active using L1 RT
LTR retro-transposons	443	227	8.29	
ERV class I	112	79.2	2.89	
ERV (K) class II	8	8.5	0.31	
ERV (L) class III	83	39.5	1.44	
MaLR	240	99.8	3.65	
DNA transposons	294	77.6	2.84	
hAT				
Charlie	182	38.1	1.39	
Zaphod	13	4.3	0.16	
Tc-1				
Tigger	57	28	1.02	
Tc2	4	0.9	0.03	
Mariner	14	2.6	0.1	
PiggyBac-like	2	0.5	0.02	
Unclassified	22	3.2	0.12	

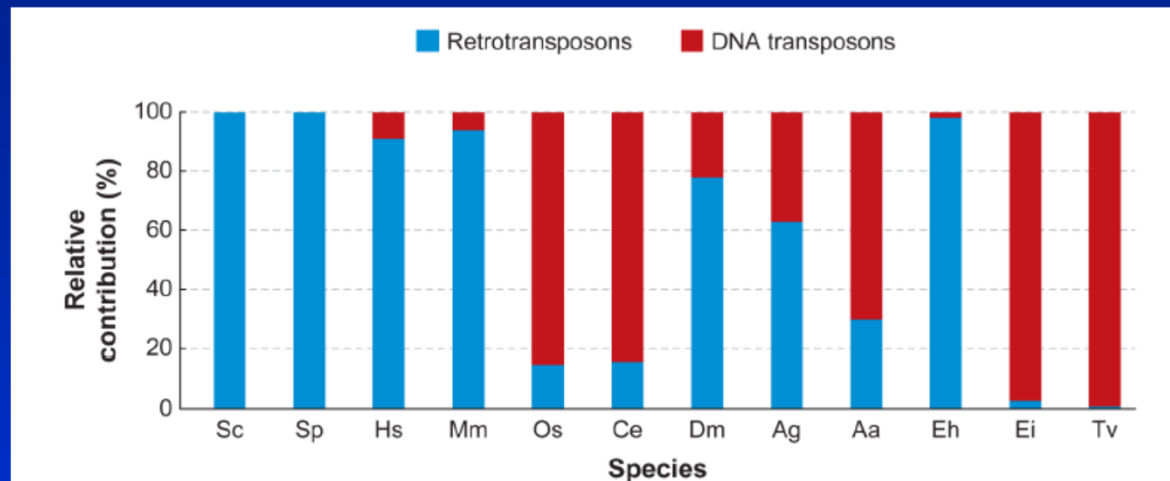


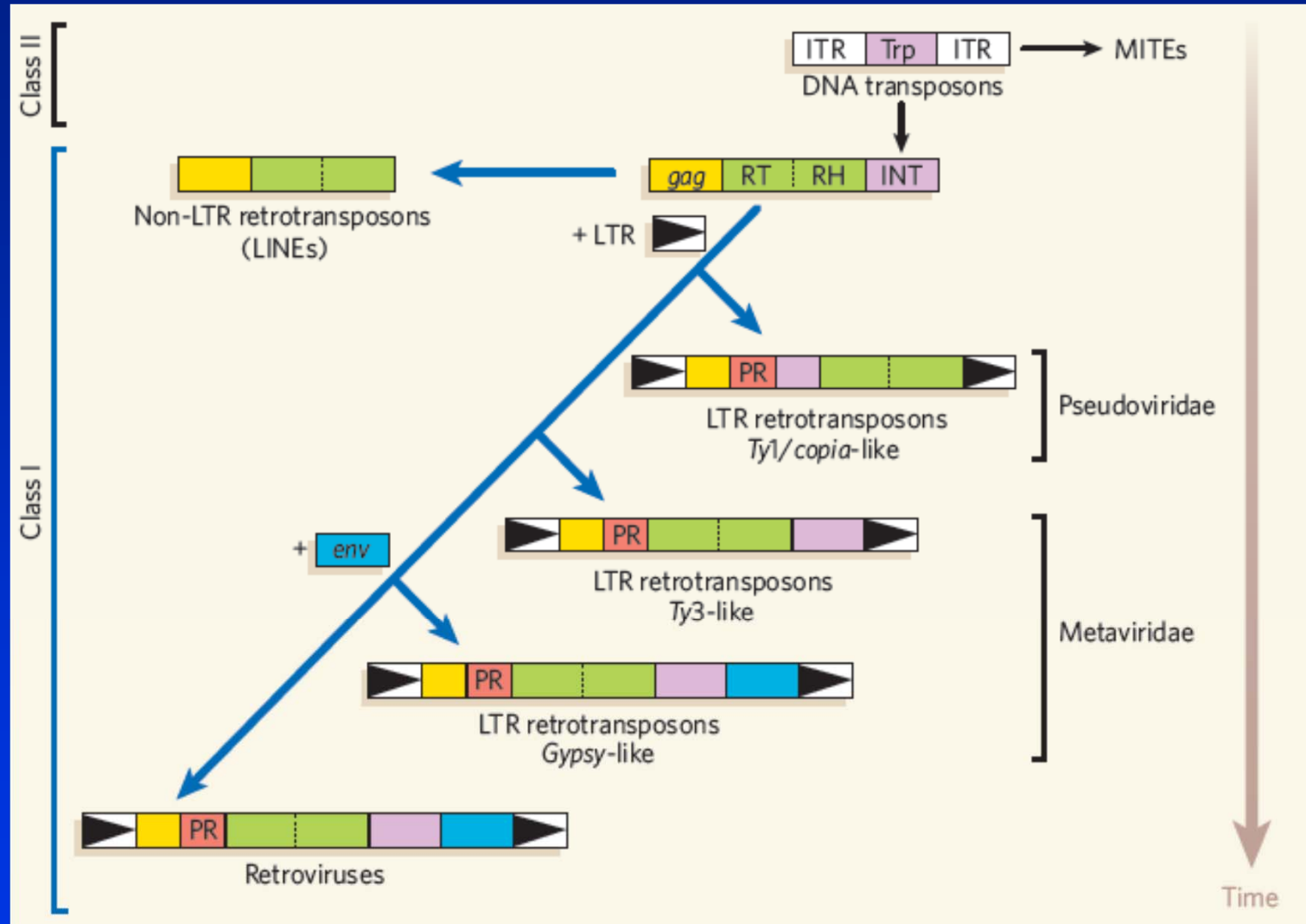
Figure 2.

The relative amount of retrotransposons and DNA transposons in diverse eukaryotic genomes. The graph shows the contribution of DNA transposons and retrotransposons in percentage relative to the total number of transposable elements in each species. The data were compiled from papers reporting draft genome sequences (references available upon request) and from the Repeatmasker output tables available at the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) or from the following sources: *E. histolytica* and *E. invadens*: (159); *T. vaginalis*: E. Pritham, unpublished data. Species abbreviations: Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Sp: *Schizosaccharomyces pombe*; Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Os: *Oryza sativa*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Ag: *Anopheles gambiae*, malaria mosquito; Aa: *Aedes aegypti*, yellow fever mosquito; Eh: *Entamoeba histolytica*; Ei: *Entamoeba invadens*; Tv: *Trichomonas vaginalis*.

Annu Rev Genet, 2007; 41:331

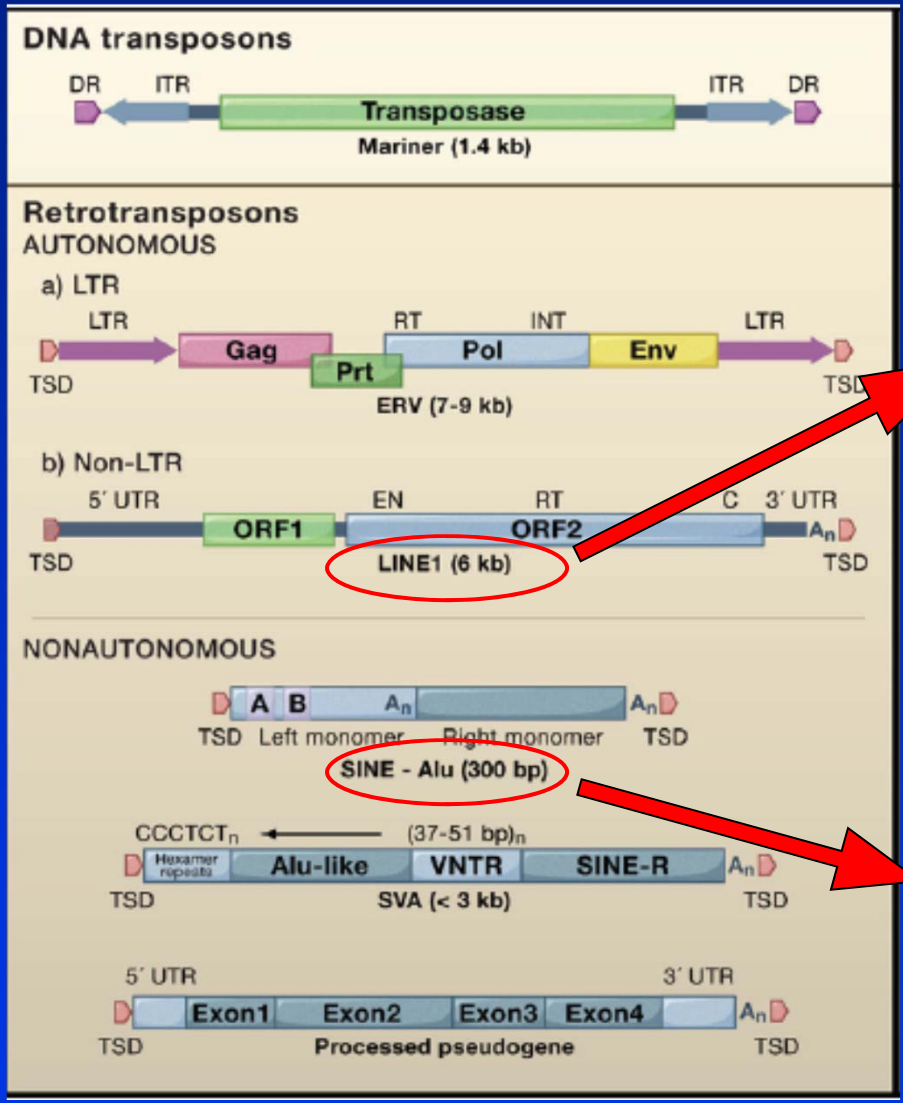
Cell, 2008; 135:poszter

Egy kis (transzpozon) evolúció 1.



Nature, 2006; 443(7111):521

Egy kis (transzpozon) evolúció 2.



A LINE1 aktivitása neuronális progenitorokban megugrik → idegsejtek mozaicizmusa!
(Trend Neurosci 2010; 33(8):345)

Az 'Alu' elemek nagy számban vannak jelen a primátákban; a genomiális evolúcióban ekkor történt egy nagy expanzió →

vajon ok vagy következmény?
(PNAS, 2011; 108(7):2837;
NSMB, 2016; 23(11):1011)

Kérdések...

A transzpozonok mint genetikai „fegyvertár”

1. Felhasználás:

- inszerziós mutagenézis
- géncsapdák, klónozás
- génbevitel → transzgénikus élőlények

2. Gerinctelen modellállatok:

- *D. melanogaster* → P-elem (újdonság!)
- *C. elegans* → Tc1/Mariner család

3. Gerincesekben DNS-alapú eszköztár sokáig hiányzott

→ retrotranszpozonok nem olyan jók:

- ☹ magasabb mutációs ráta (rev. transzkripció)
- ☹ újra mobilizálhatók (instabilitás)
- ☹ nem jó integrációs profil

A használt transzpozonos rendszerek

Eukarióta transzpozonok:

- II. Osztály (DNS transzpozonok)
 - Tc1/mariner szupercsalád

„cut & paste” transzpozíciós mechanizmus

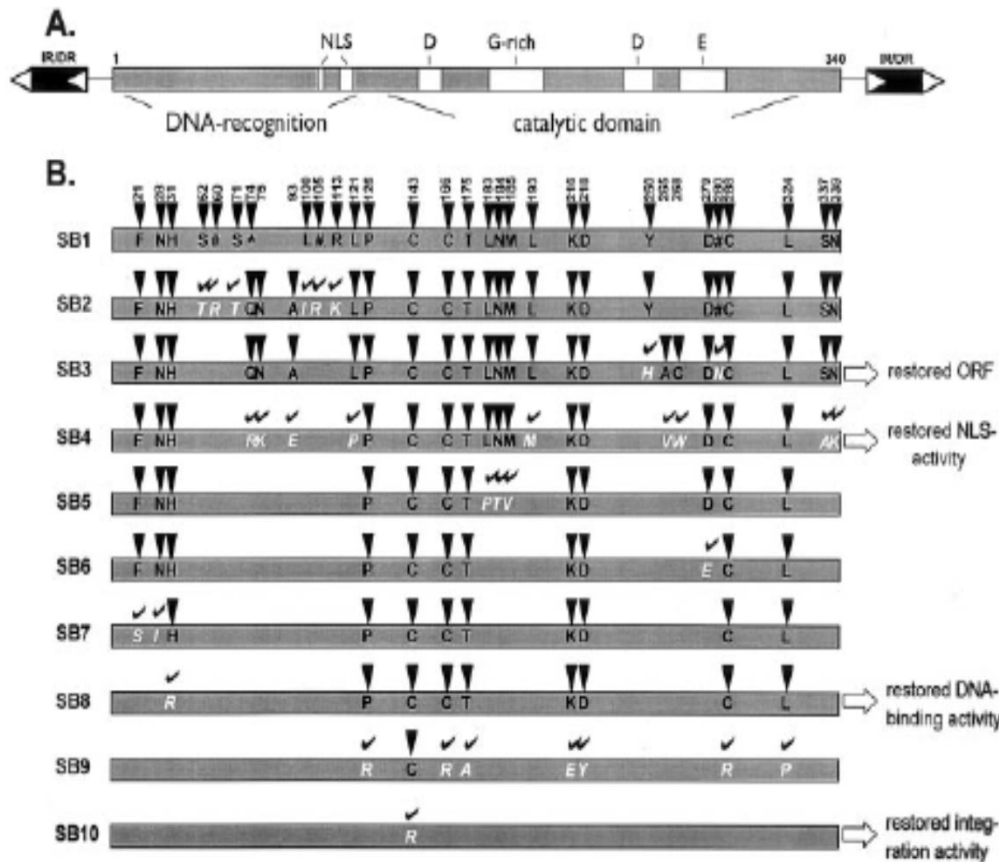


„Sleeping Beauty”

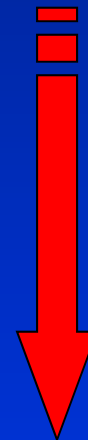


„Frog Prince”

Sleeping Beauty / Frog Prince eredete



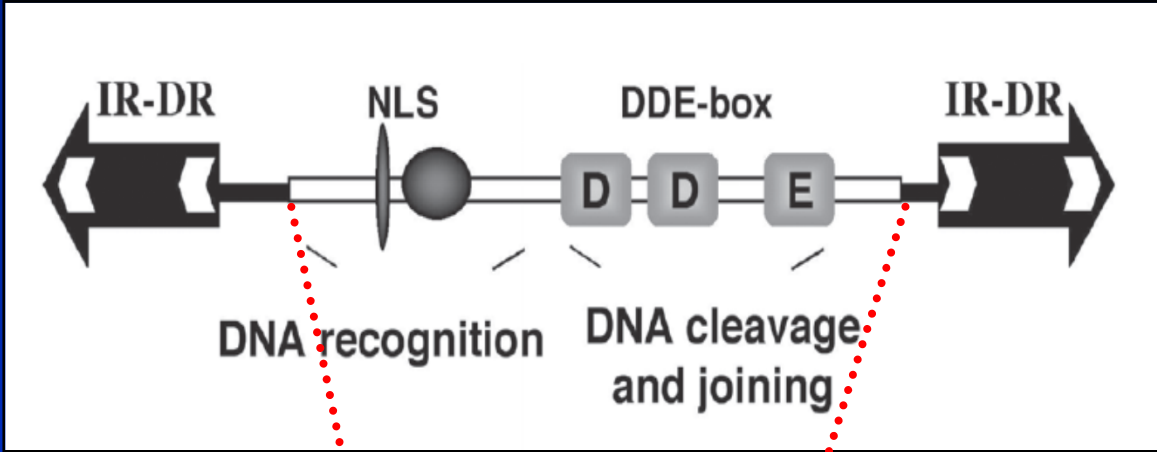
halból / békából izolált, inaktív transzpozonokból indultak ki



a transzpozáz aktivitásának visszaállítása irányított mutagenézissel

Zoltán Ivics, Perry B. Hackett, Ronald H. Plasterk and Zsuzsanna Izsvák, *Cell*, 1997; 91:501
 Csaba Miskey, Zsuzsanna Izsvák, Ronald H. Plasterk and Zoltán Ivics, *NAR*, 2003; 31:6873

Az aktív transzpozon szerkezete

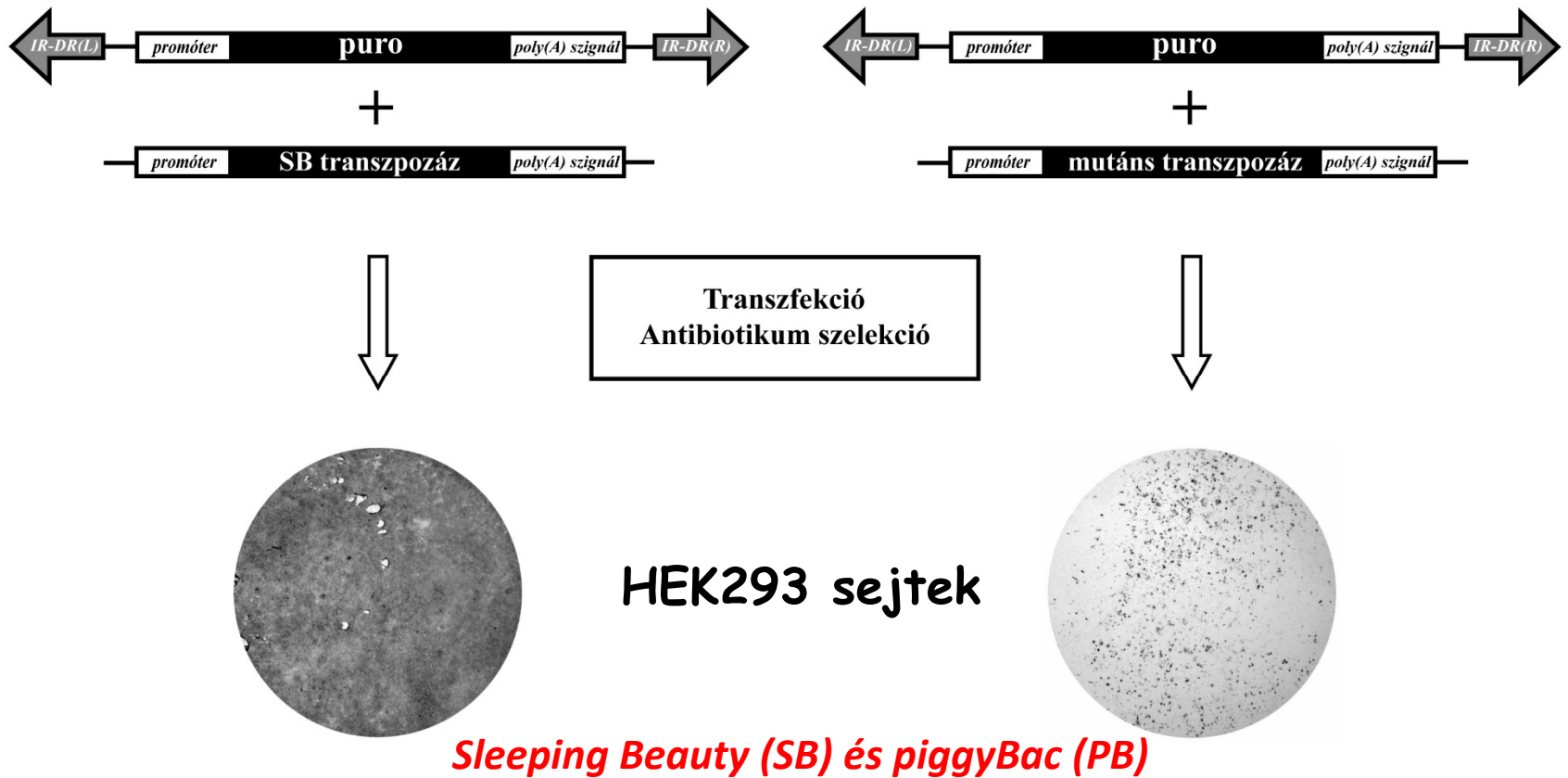


Transzpozáz



Ivics and Izsvak, Methods in Molecular Biology, 2004; 260: 255-276.

DNS transzpozonok: génbeviteli eszköztár



Kolacsek et al. (2011) *Mobile DNA*

Kolacsek et al. (2014) *Human Gene Therapy Methods*

Miért épp a DNS transzpozonok? (a virális rendszerekkel szemben)

- Olcsóbb, könnyebb kivitelezni.
- Az etikai aggályok kisebbek.
- Random integráció,
nincs preferencia a működő gének irányába (→ SB).
(⇔ *piggyBac*, vagy *Tol2* !!)
- Nem osztódó sejtekben is működik.
- Szűk keresztmetszet a transzfekeciós hatékonyság...

Még egy indok... az SB100x

Molecular evolution of a novel hyperactive *Sleeping Beauty* transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates

Lajos Mátés^{1,6}, Marinee K L Chuah^{2,6}, Eyayu Belay², Boris Jerchow¹, Namitha Manoj¹, Abel Acosta-Sanchez², Dawid P Grzela¹, Andrea Schmitt¹, Katja Becker¹, Janka Matrai², Ling Ma², Ermira Samara-Kuko², Conny Gysemans³, Diana Pryputniewicz¹, Csaba Miskey¹, Bradley Fletcher⁴, Thierry VandenDriessche², Zoltán Ivics¹ & Zsuzsanna Izsvák^{1,5}

Nat Genet, 2009; 41(6):753

Az új hiperaktív SB100x transzpozáz aktivitása összemérhető a leghatékonyabb virális génbeviteli rendszerekkel.

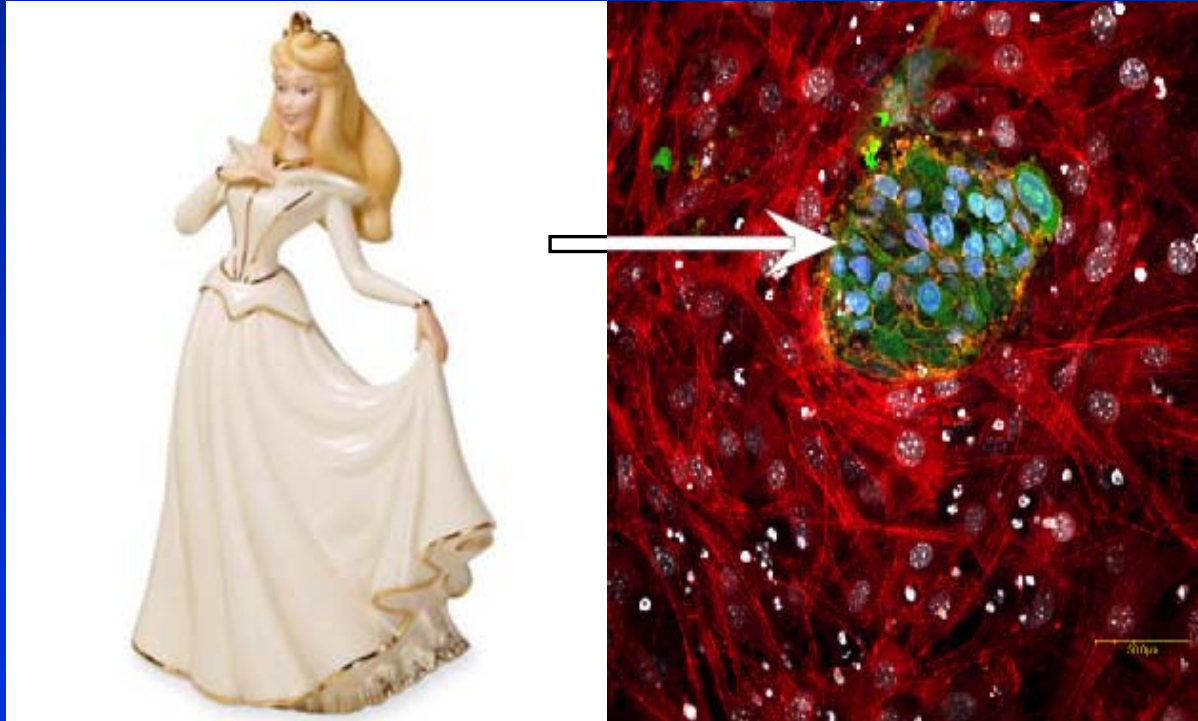
Az SB100x transzpozáz 2009-ben az év molekulája -
a Science folyóirat által kiválasztva:

[http://www.biotechniques.com/news/Sleeping-](http://www.biotechniques.com/news/Sleeping-Beauty-named-Molecule-of-the-Year/biotechniques-187068.html?autnID¼191663)

[Beauty-named-Molecule-of-the-Year/biotechniques-187068.html?autnID¼191663](http://www.biotechniques.com/news/Sleeping-Beauty-named-Molecule-of-the-Year/biotechniques-187068.html?autnID¼191663)

Kérdések...

Génbevitel humán embrionális őssejtekbe a *Sleeping Beauty* rendszerrel

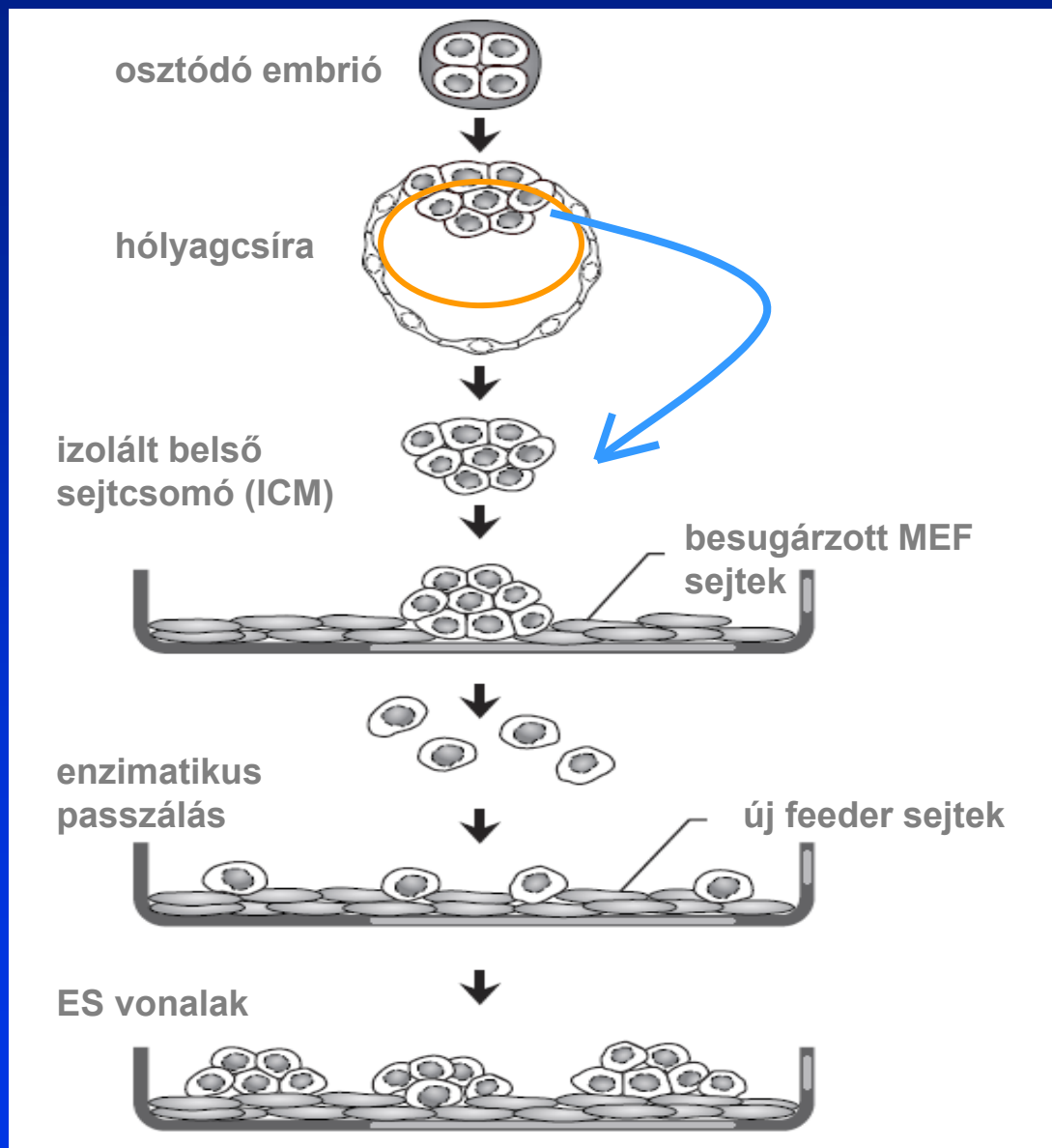


A humán embrionális őssejtvonalak eredete

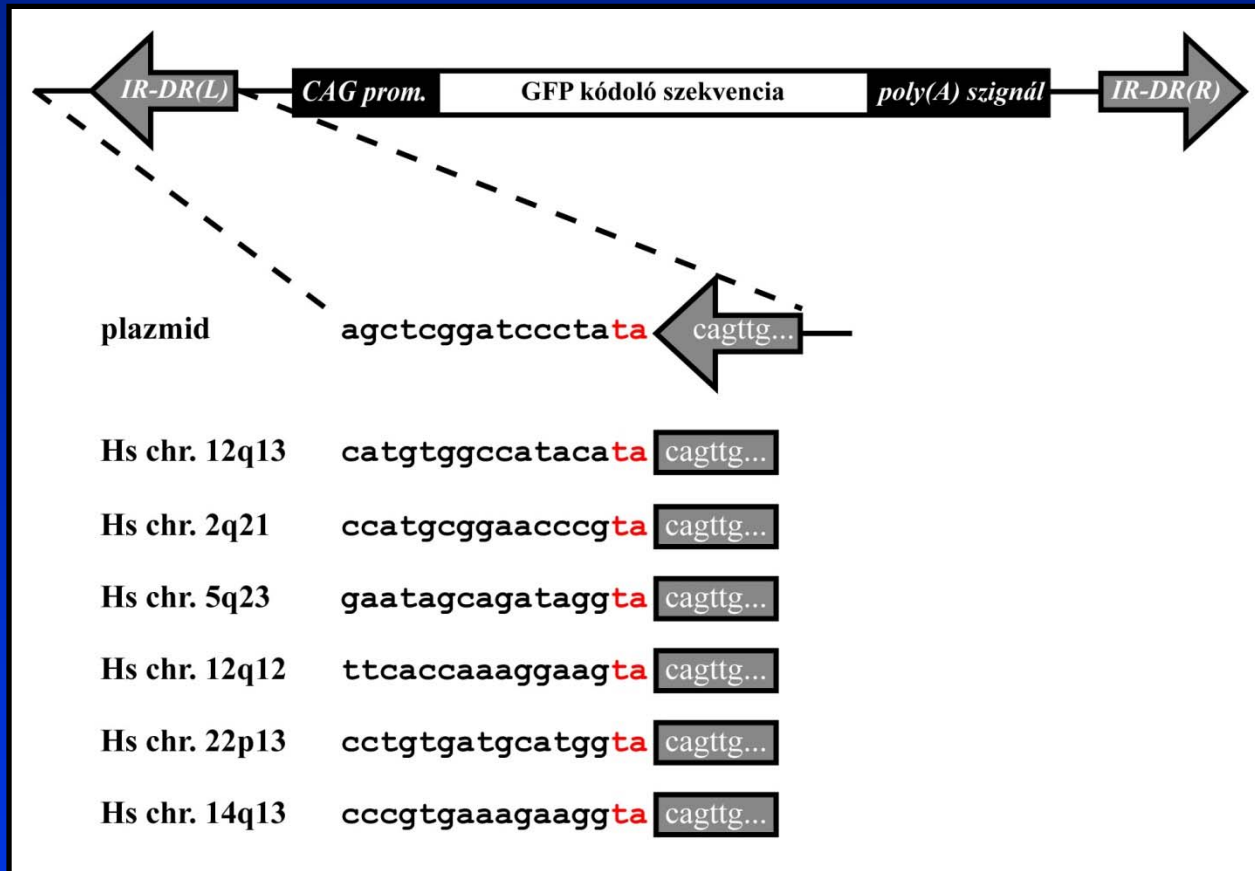
a hólyagcsíra állapotú embrióban már két eltérő fejlődési képességgel rendelkező sejtípus található

- belső sejtcsomó sejtjei
- trofoektoderma sejtek

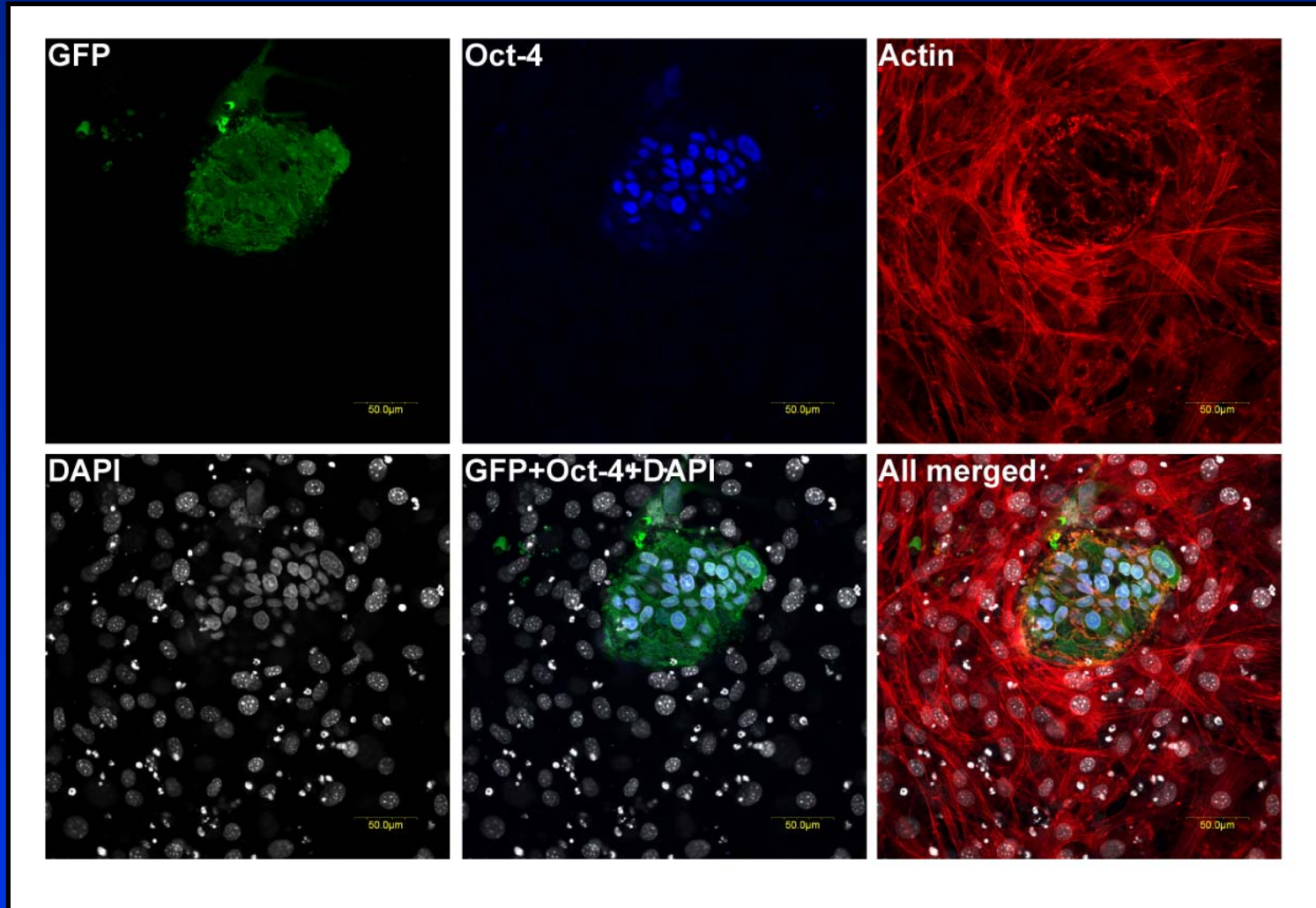
a belső sejtcsomó (ICM) sejtjeit tenyésztik tovább



Bizonyíték a transzpozícióra: integrációs helyek

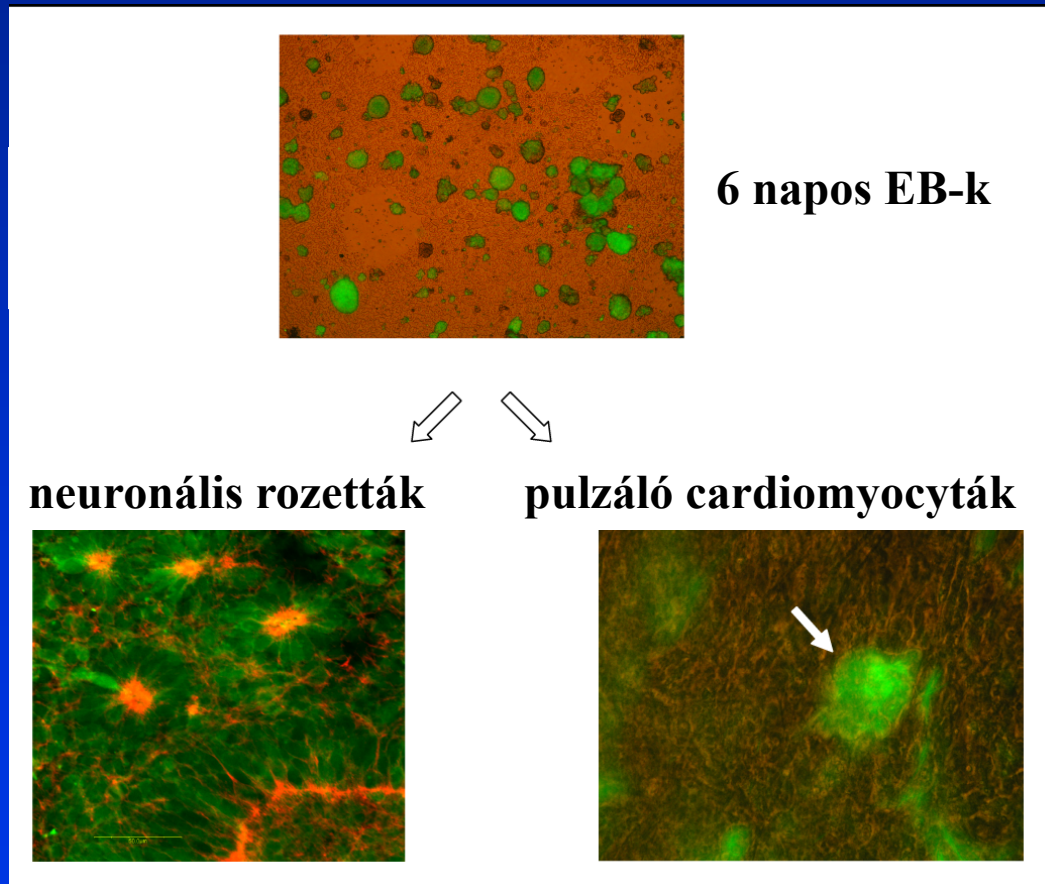


GFP klónok pluripotenciája I. : Oct4 fehérje



Őssejtklónok differenciációja

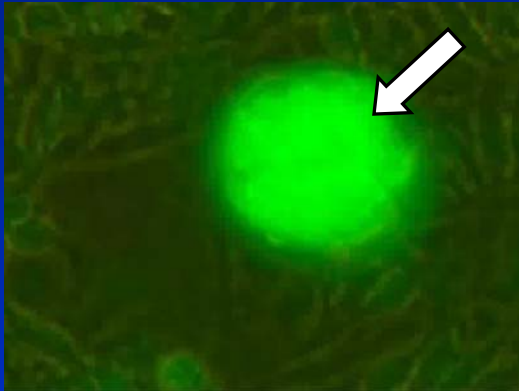
- spontán differenciáció „embrioid testek”-en (EB) keresztül:
(teratómaszerű struktúrák)



CAG promóter:
erős transzgén expresszió
a szívizomsejtekben ?!

Cardiomyocita irányú differenciáció

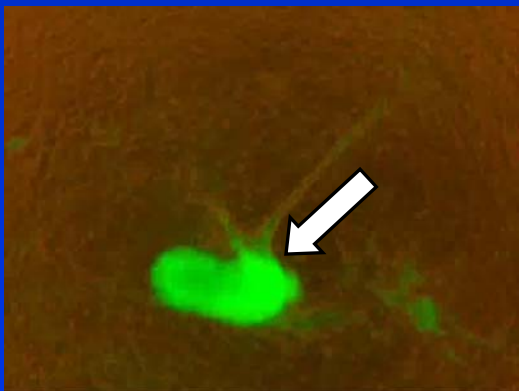
SB-CAG-GFP



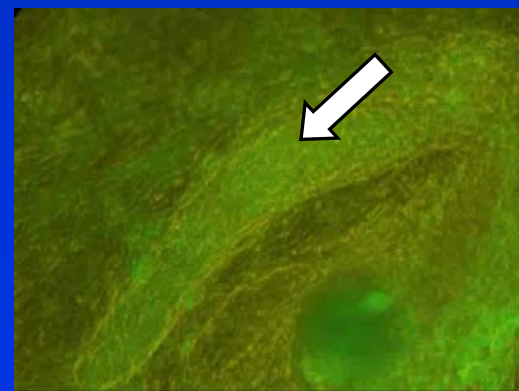
SB-EF1 α -GFP



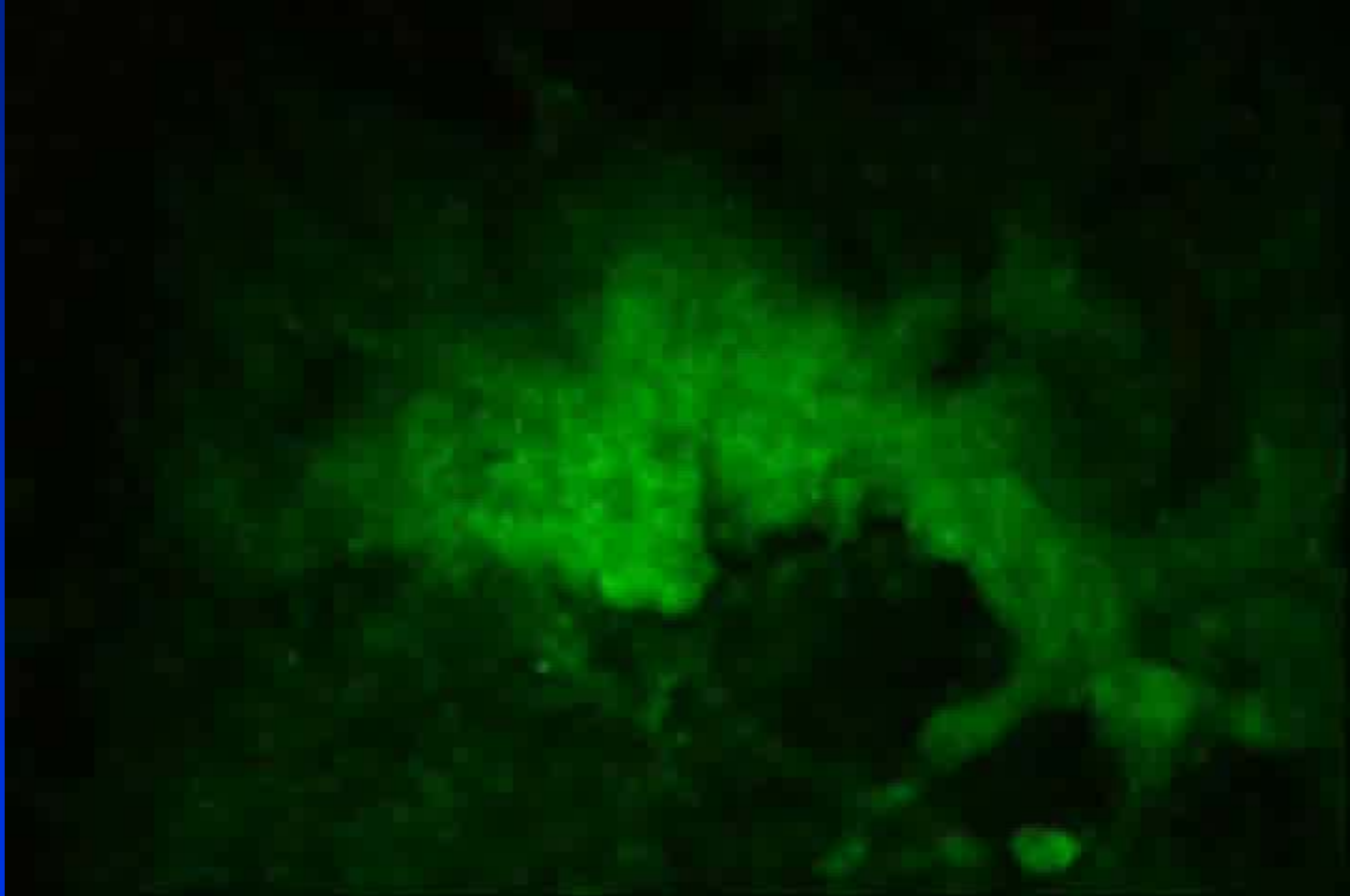
LV-CAG-GFP



LV-EF1 α -GFP



Farmakológiai tesztelések

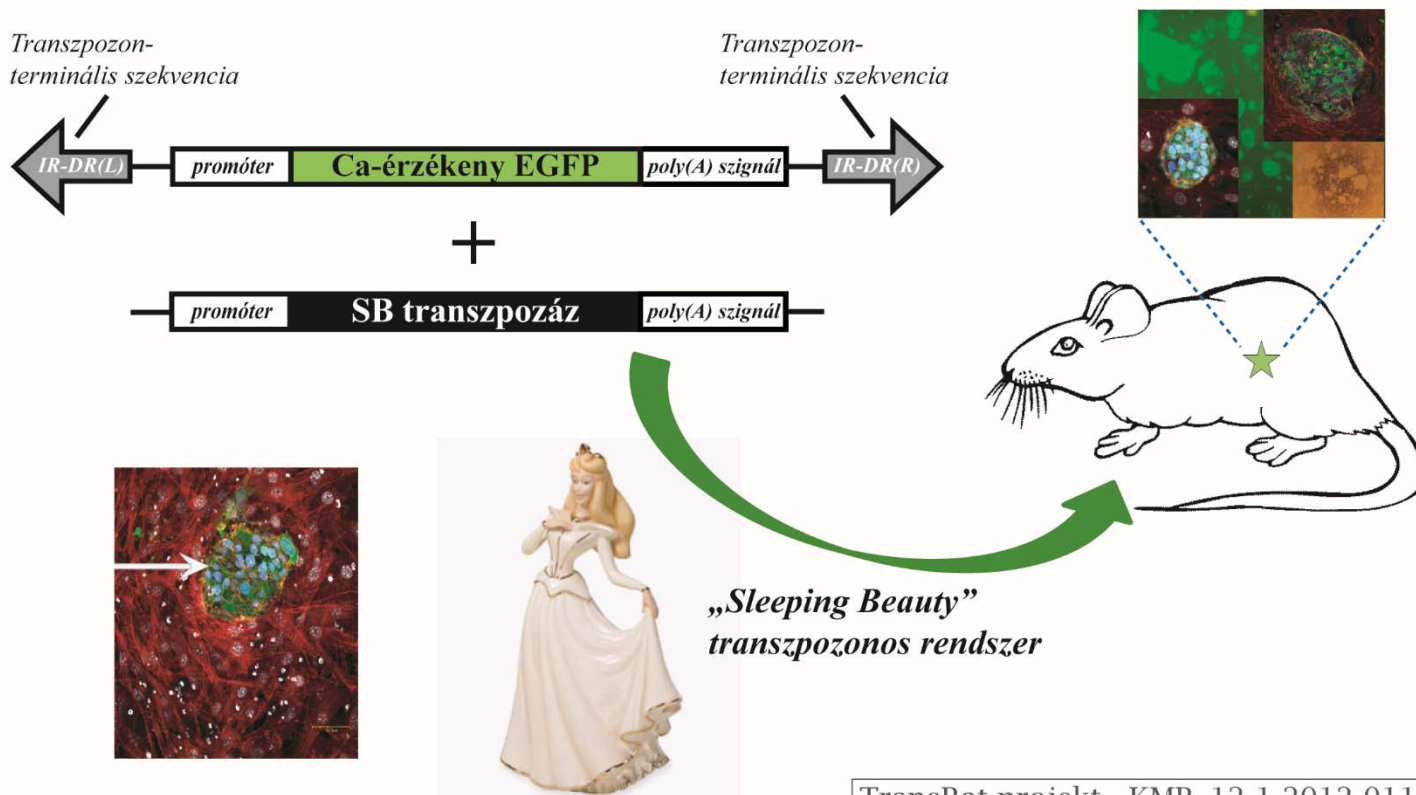


+adrenalin / +verapamil

Orbán et al. (2009) Stem Cells

Kérdések...

Transzgenikus patkányok transzpozonokkal

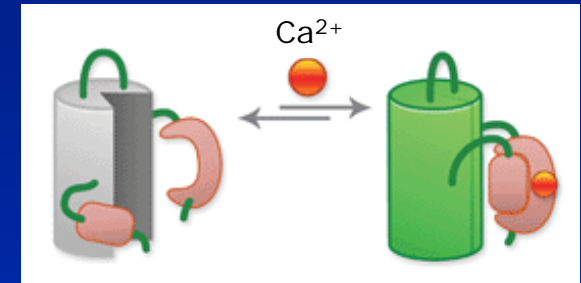
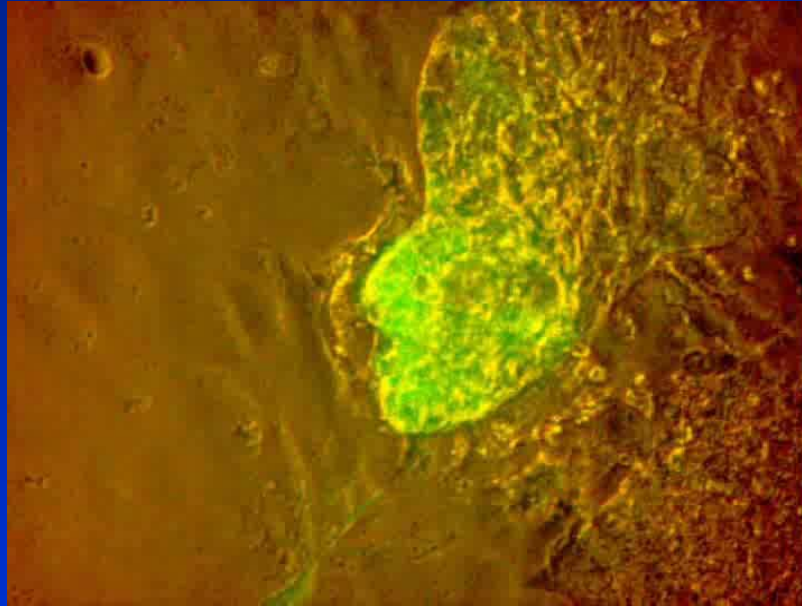


CAG-GCaMP2 / rGFA-RGECO

Szebényi et al. (2015) *J Am Soc Nephrol*

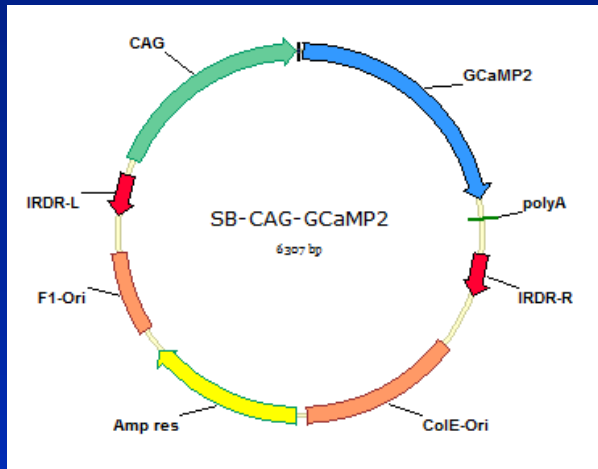
Szebényi et al. (2015) *Scientific Reports*

Kalciumjelek GCaMP2-vel



- GCaMP2*:
- kalcium-szenzitív GFP
 - calmodulin domén beépítésével

Transzgén mikroinjektálás



+ *SB100x* transzpozáz mRNS formájában



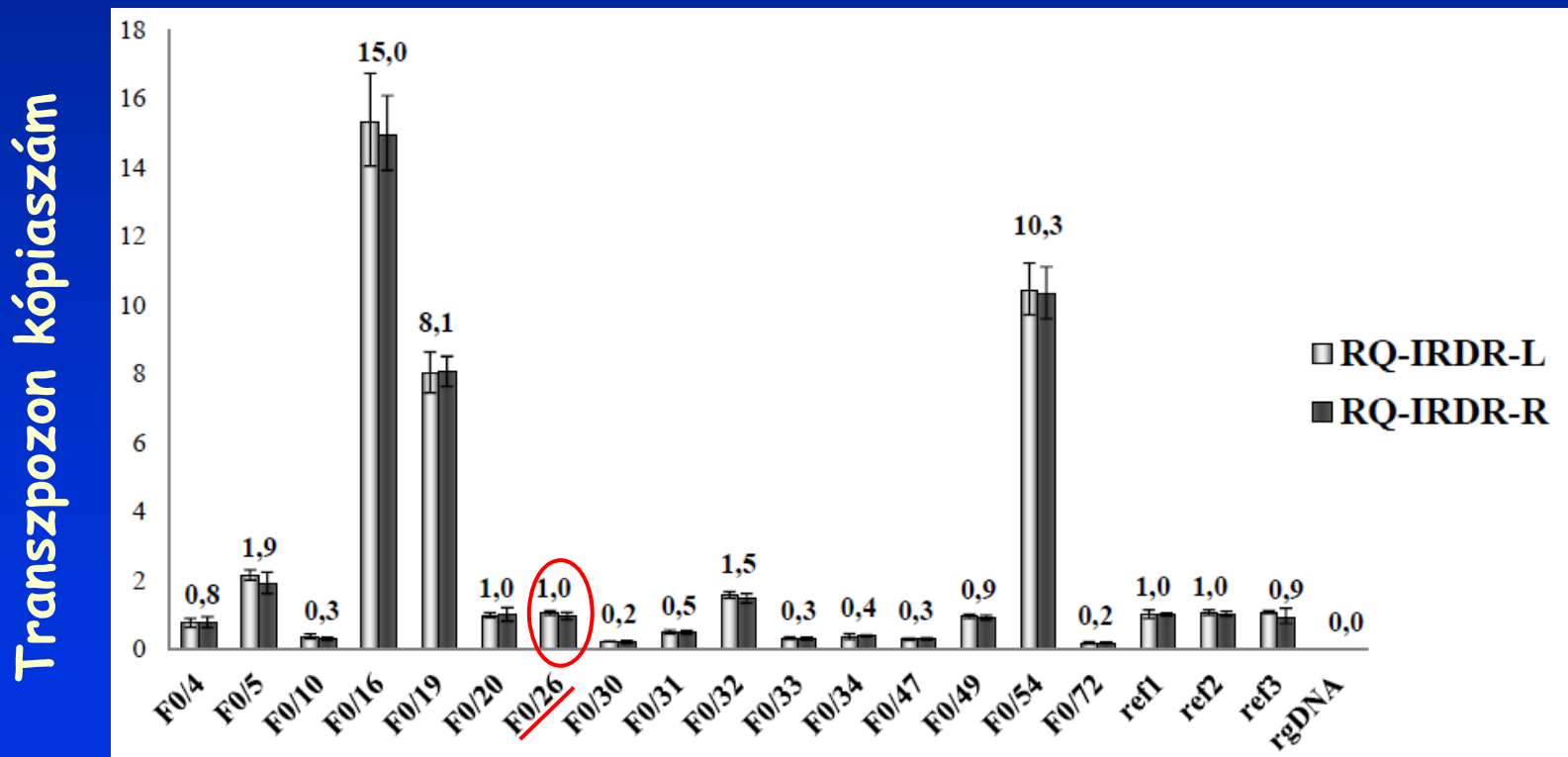
1. Mikroinjektálás az apai előmagba
2. Beültetés áterhes nőstényekbe
3. Megszületik az alapító (F0) generáció

(Sprague-Dawley törzsből származó petesejt Wistar nőstény recipiensekbe)

F0 egyedek genetikai szűrése

PCR és real-time PCR → már itt kópiaszám alapú válogatás!

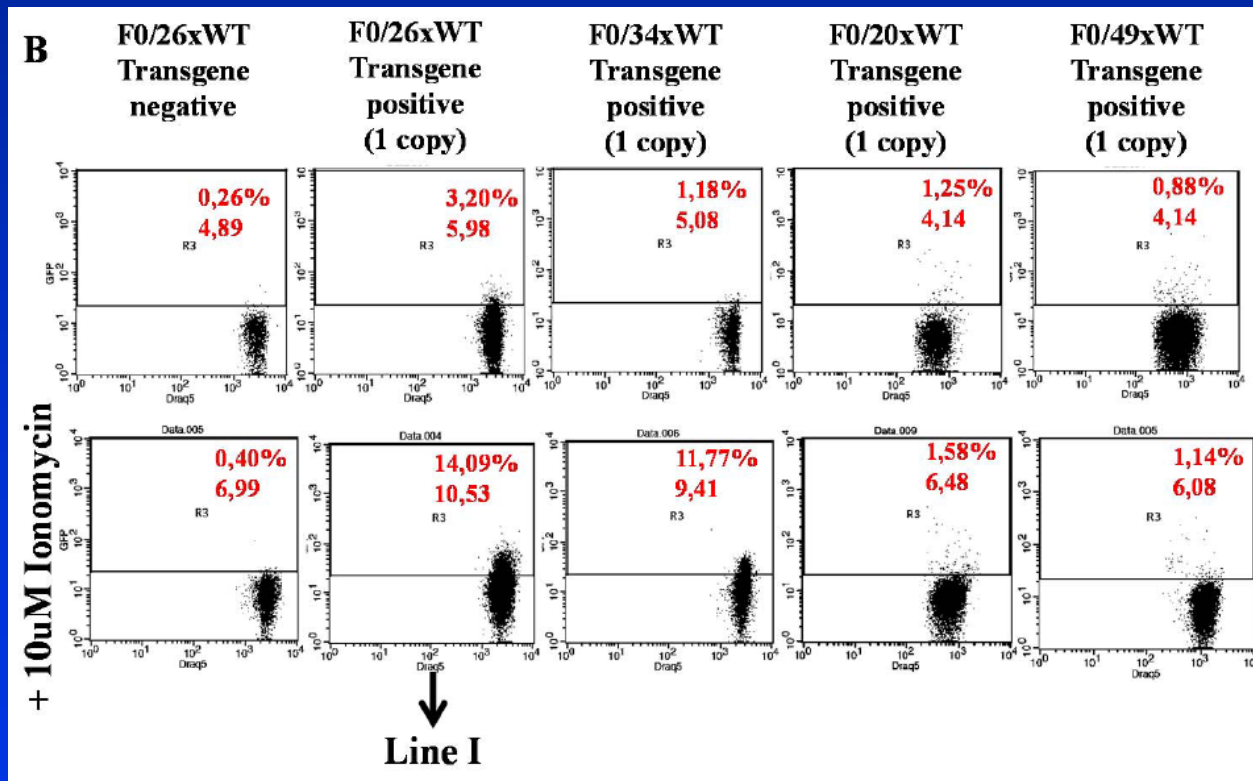
75 újszülöttből 16 hordozó → ~21%-os hatékonyság!



F1 generáció létrehozása és szűrése

Alacsony kópiaszámú F0 egyedek keresztezése vad típusú egyedekkel

Az F1 utódok fenotípusos szűrése:
GCaMP2 expresszió vérsejtekben, FACS alapú méréssel



+ Ionomycin

Ca²⁺ szint ↑

GCaMP2 exp. ↑

Stabil kétkópiás vonal létrehozása (haploid egykópiás)

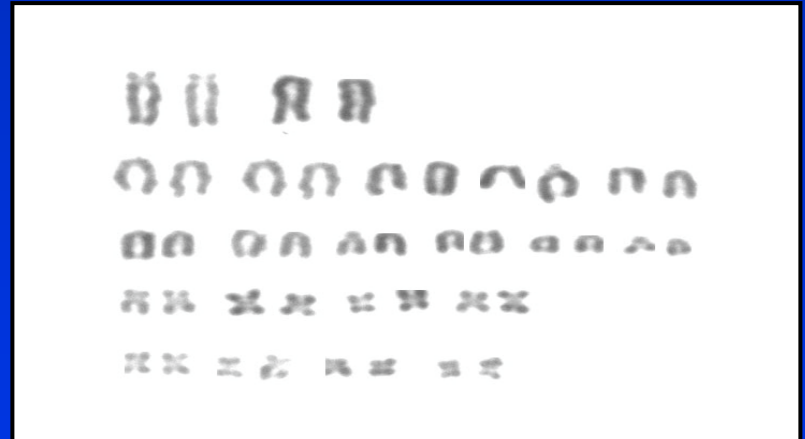
- Vad típussal keresztezés, „tisztázás”
- Heterozigóta egyedek keresztezése, beltenyésztés
- A vonal jellemzése: genetikai stabilitás, fenotípusos jellemzés:

stabil **kópiaszám (2)**
és **integrációs hely**
már >18 generáción keresztül

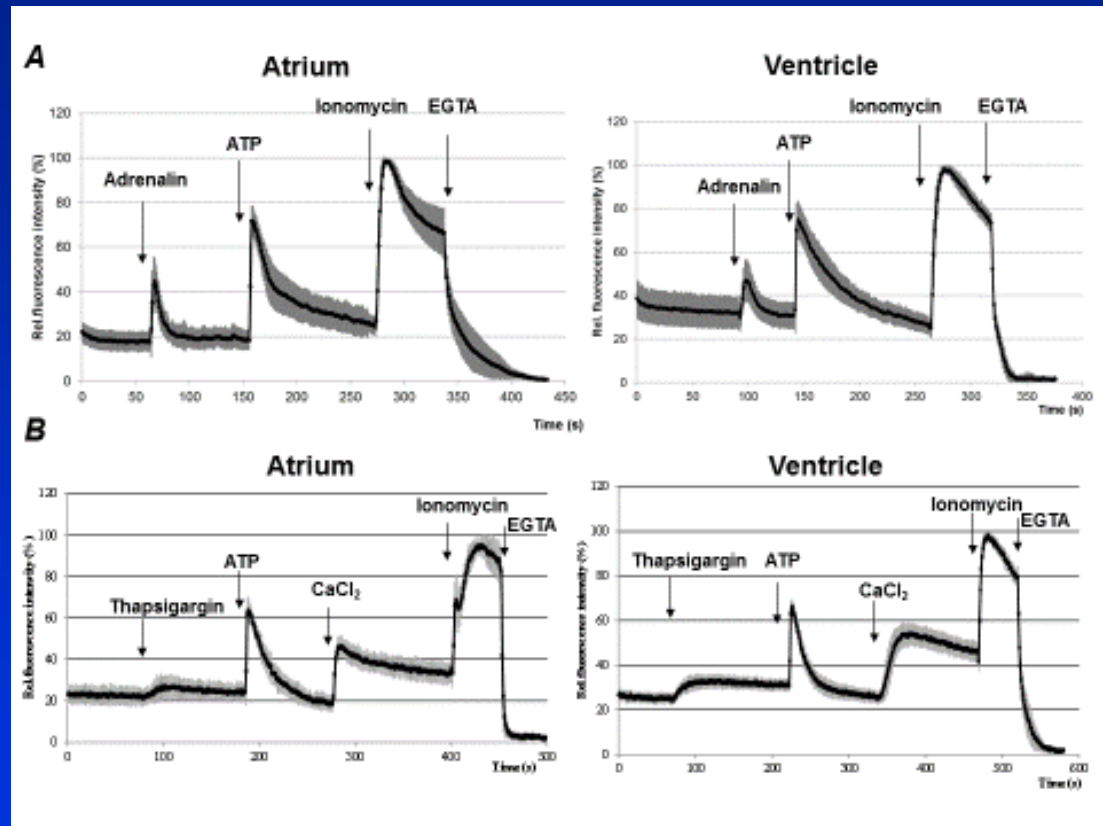
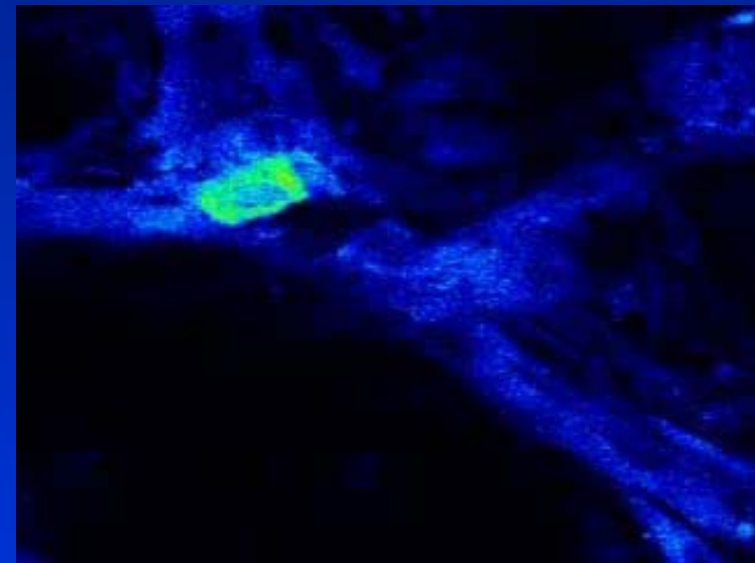
normális és stabil
kariotípus
(**21 pár kromoszóma**)

```
GGGACTAGGTTGGGCTAAGAGTGAAGACTCTTTAGC
TGTCGTTCTATGGCAATCCTGACAGGATTCCACTCCC
CTTGTAAGAGCAGGTACAGTTGAAGTCGGAAGTTTA
CATACACCTTAGCCAATCACTAGTGAATTGCGGGC
CGCCT
```

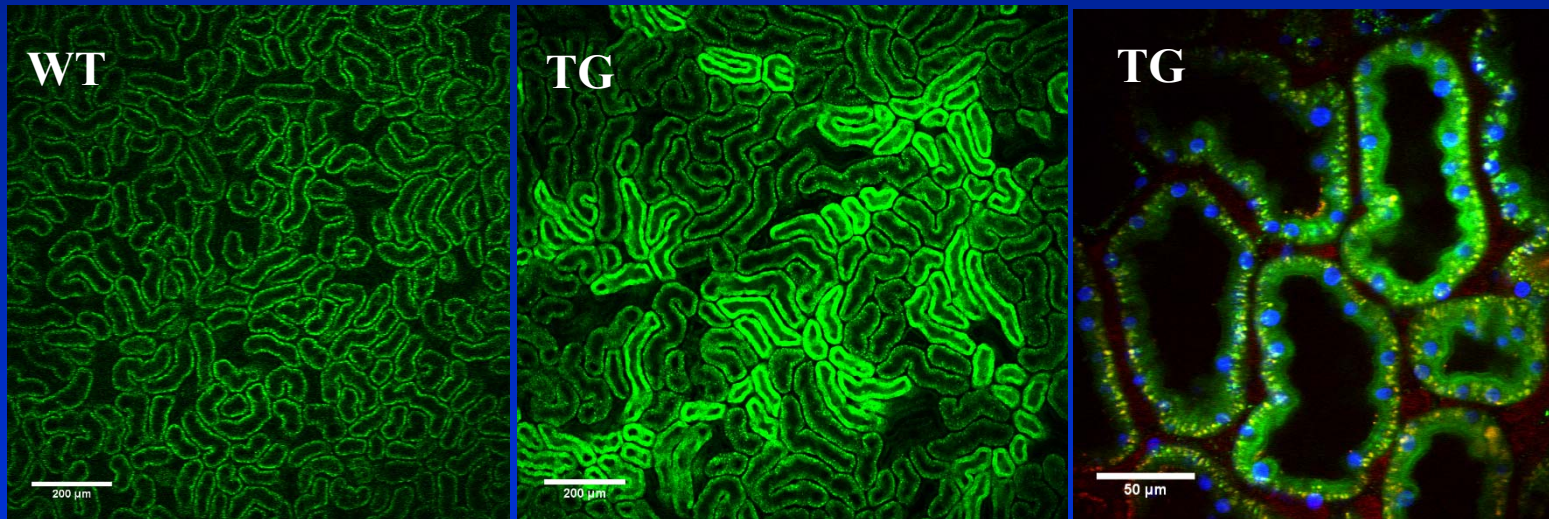
Line I. – *Sleeping Beauty* transposon integration locus
in the rat genome/ Chromosome 9, intergenic region
Ref. seq: NC_005108.3, nucleotide position:78819834
(**bold**: IRDR-R transposon sequence)



Szív szeletek, *in vitro* kultúrák

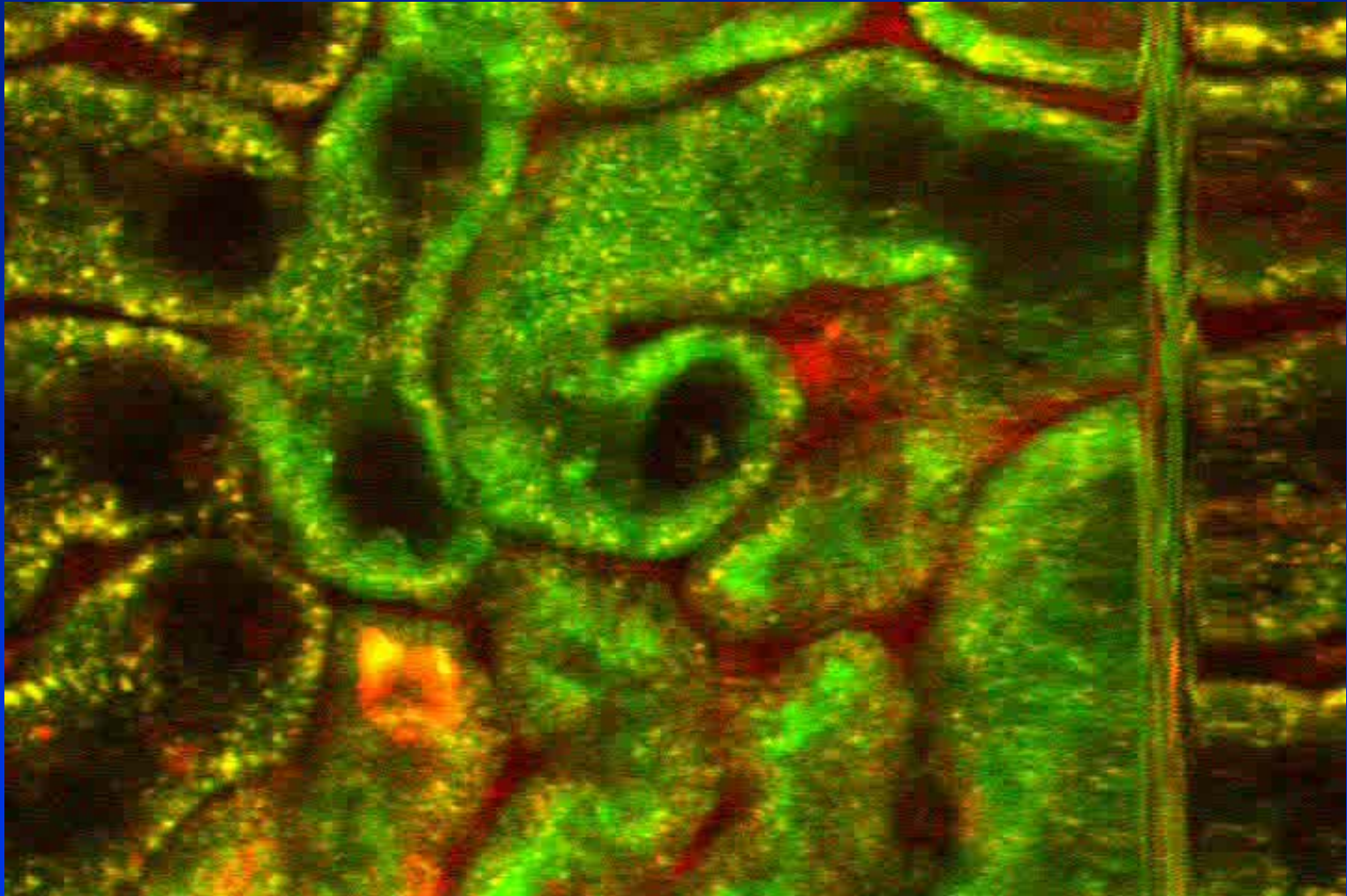


A CAG-GCaMP2 Ca²⁺ indikátor fehérje expressziója patkány vesében in vivo



Miért ennyire heterogén?

A CAG-GCaMP2 Ca^{2+} indikátor fehérje expressziója patkány vesében in vivo



Köszönöm a figyelmet!