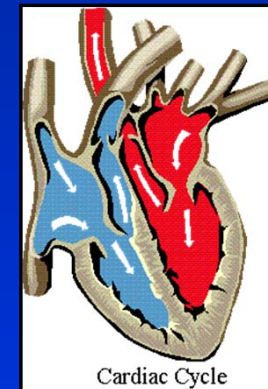
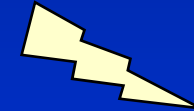
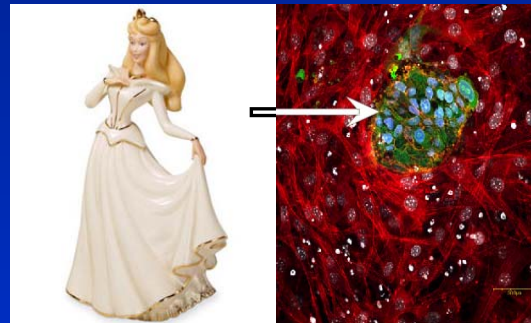
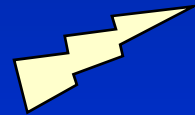
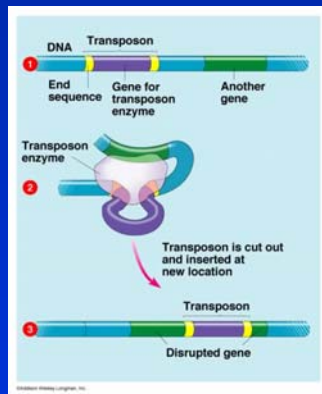


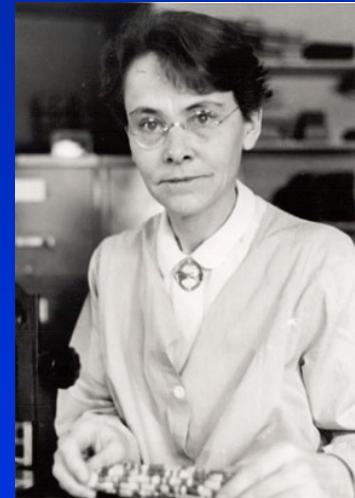
# A modern genetika eszköztára, avagy ugráló génekkel a szívizom nyomában



Orbán Tamás  
*MTA TTK Enzimológiai Intézet, Budapest*

## 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:



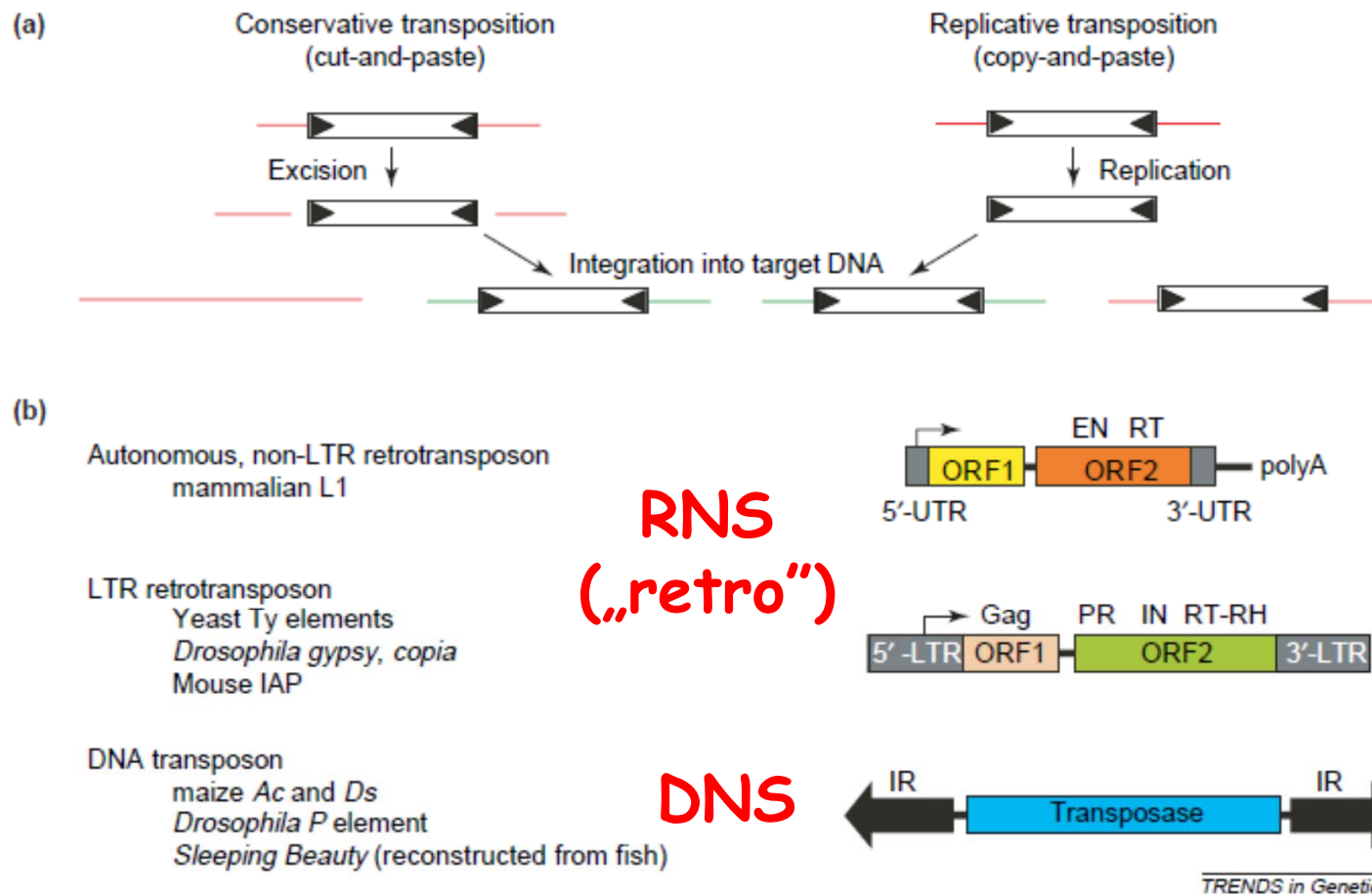
- valójában pontosabb:

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



*Trend Genet, 2005; 21(1):8*

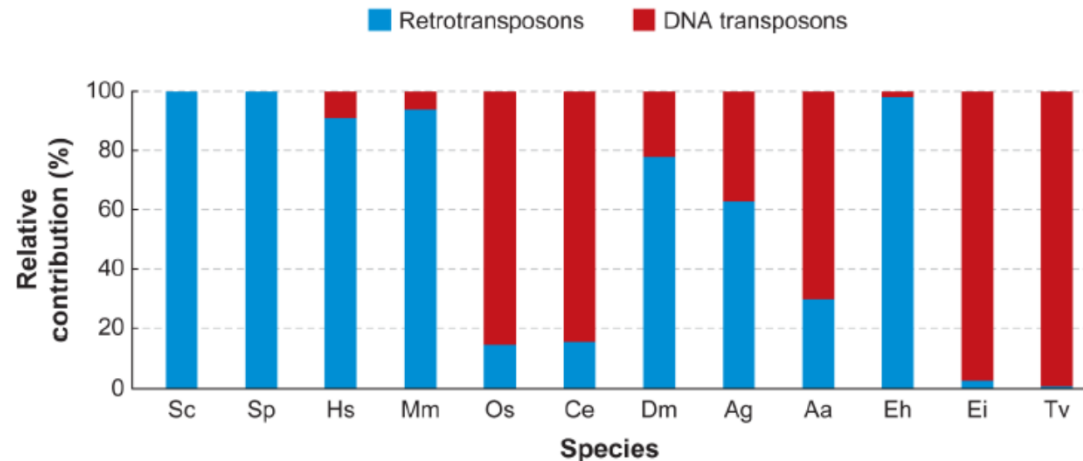
# Eukarióta mobilis elemek osztályozása

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

(Nat Rev Genet, 2007; 8:973)

# Transzpozonok mindenhol...

Human Genome ~3200 Mb	# of Copies ( $\times 1000$ )	Total Length (Mb)	% of Genome	Active
<b>LINEs</b>	<b>868</b>	<b>558.8</b>	<b>20.42</b>	
LINE1 <sup>1</sup>	516	462	16.89	Active
LINE2	315	88.2	3.22	
LINE3	37	8.4	0.31	
<b>SINEs</b>	<b>1558</b>	<b>359.6</b>	<b>13.29</b>	
Alu <sup>1</sup>	1090	290.1	10.6	Active using L1 RT
MIR	393	60.1	2.2	
MIR3	75	9.3	0.34	
SVA <sup>1</sup>	2.76	4.2	0.15	Active using L1 RT
<b>LTR retro-transposons</b>	<b>443</b>	<b>227</b>	<b>8.29</b>	
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	
<b>DNA transposons</b>	<b>294</b>	<b>77.6</b>	<b>2.84</b>	
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	



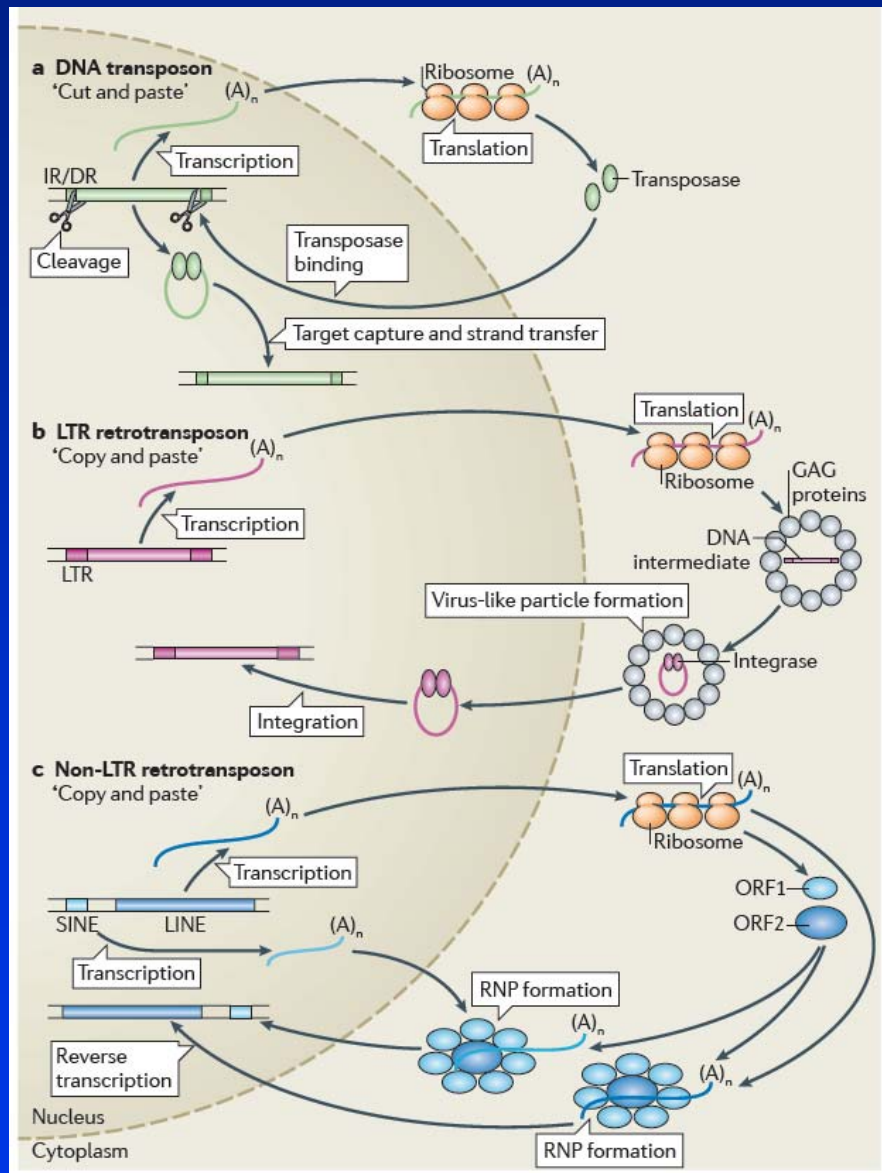
**Figure 2.**

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*

# A transzpozíció néhány mechanizmusa

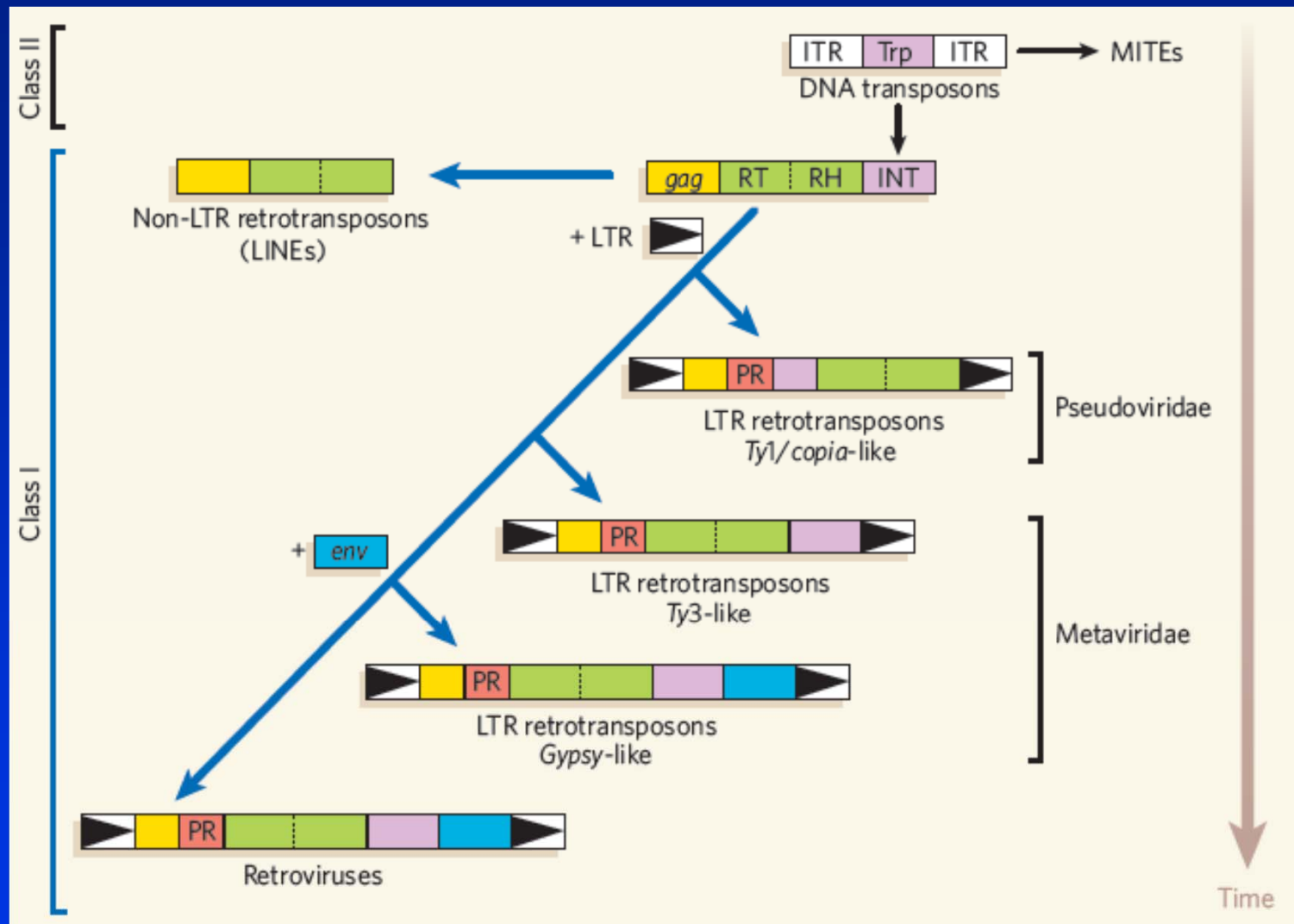


A(z eukarióta) genom is védekezik, pl.:

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

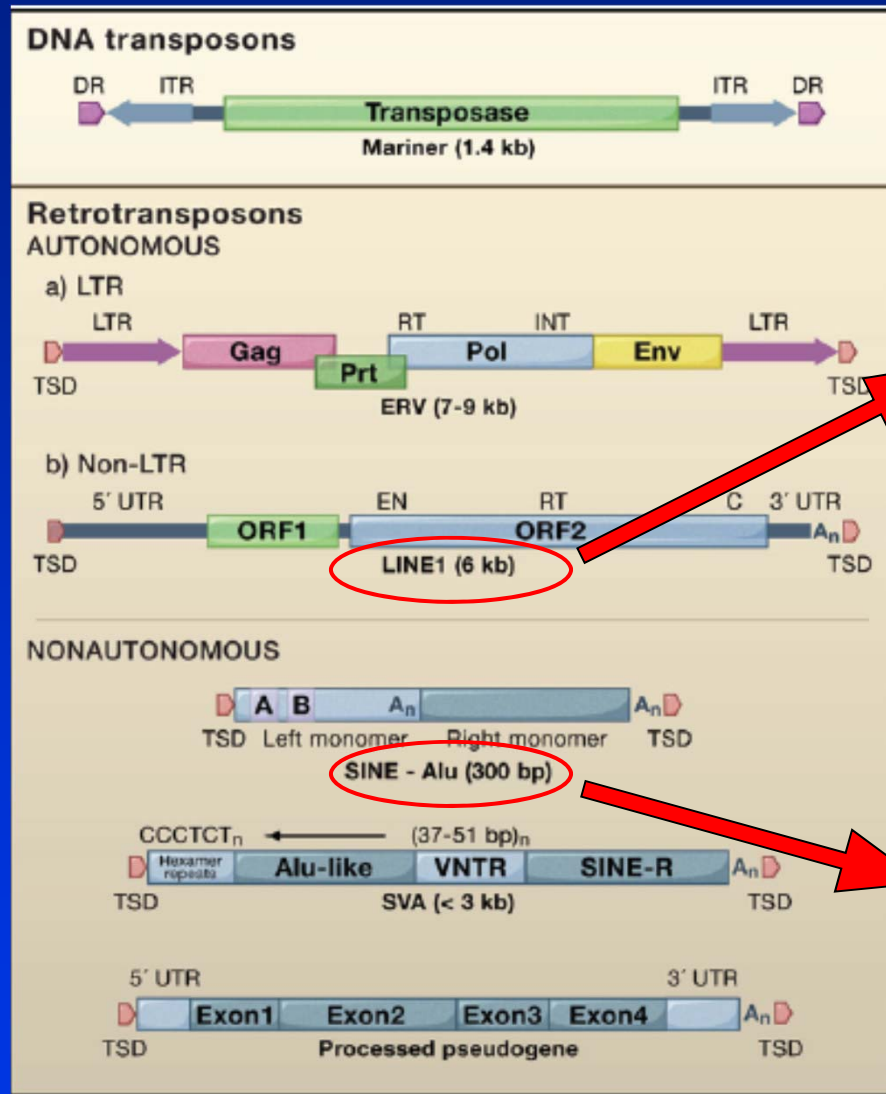


# Egy kis (transzpozon) evolúció 1.



*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)

Cell, 2008; 135(1):23

**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 supercsalád

„cut & paste” transzpozíciós mechanizmus

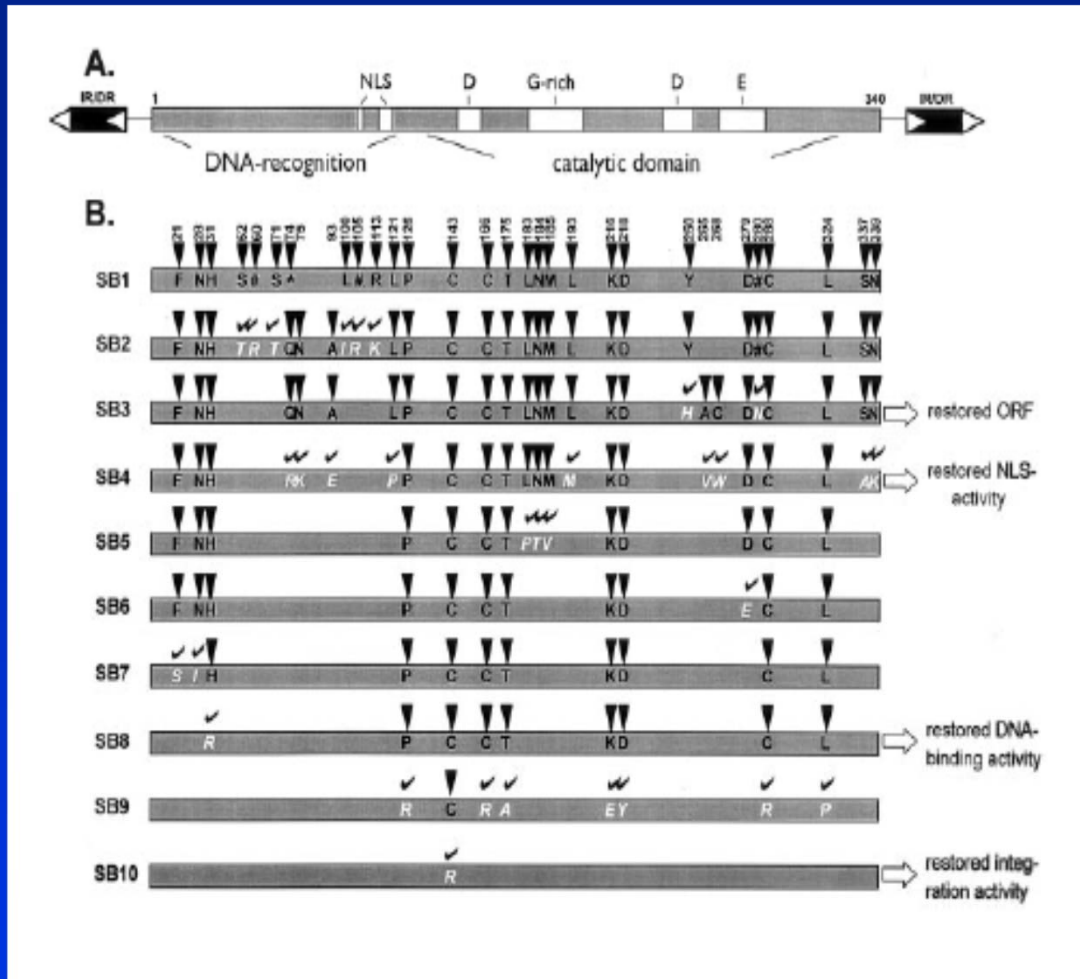


„Sleeping Beauty”



„Frog Prince”

# Sleeping Beauty / Frog Prince eredete

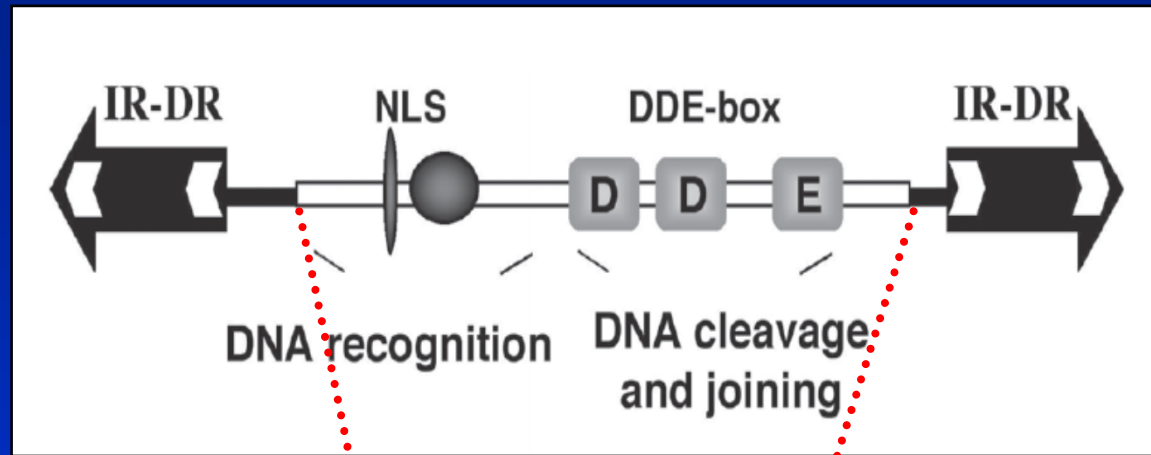


halból / békából izolált, inaktív transzpozonokból indultak ki

a transzpozáz aktivitásának visszaállítása irányított mutagenezissel

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

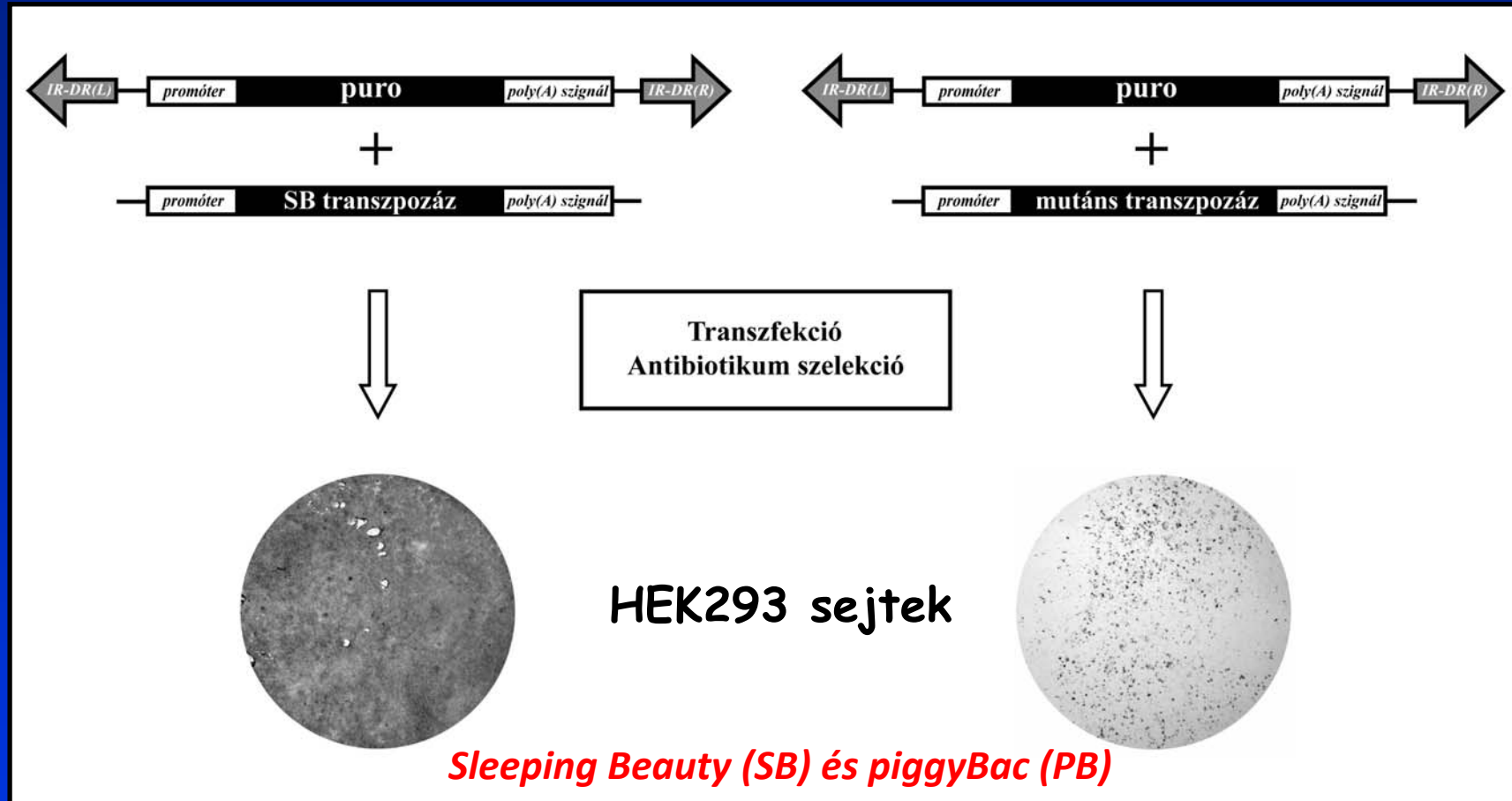


Transzpozáz

IR Kiválasztott gén IR

CMV transzpozáz

# 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<sup>1,6</sup>, Marinee K L Chuah<sup>2,6</sup>, Eyayu Belay<sup>2</sup>, Boris Jerchow<sup>1</sup>, Namitha Manoj<sup>1</sup>, Abel Acosta-Sanchez<sup>2</sup>, Dawid P Grzela<sup>1</sup>, Andrea Schmitt<sup>1</sup>, Katja Becker<sup>1</sup>, Janka Matrai<sup>2</sup>, Ling Ma<sup>2</sup>, Ermira Samara-Kuko<sup>2</sup>, Conny Gysemans<sup>3</sup>, Diana Pryputniewicz<sup>1</sup>, Csaba Miskey<sup>1</sup>, Bradley Fletcher<sup>4</sup>, Thierry VandenDriessche<sup>2</sup>, Zoltán Ivics<sup>1</sup> & Zsuzsanna Izsvák<sup>1,5</sup>

*Nat Genet*, 2009; 441(6):753

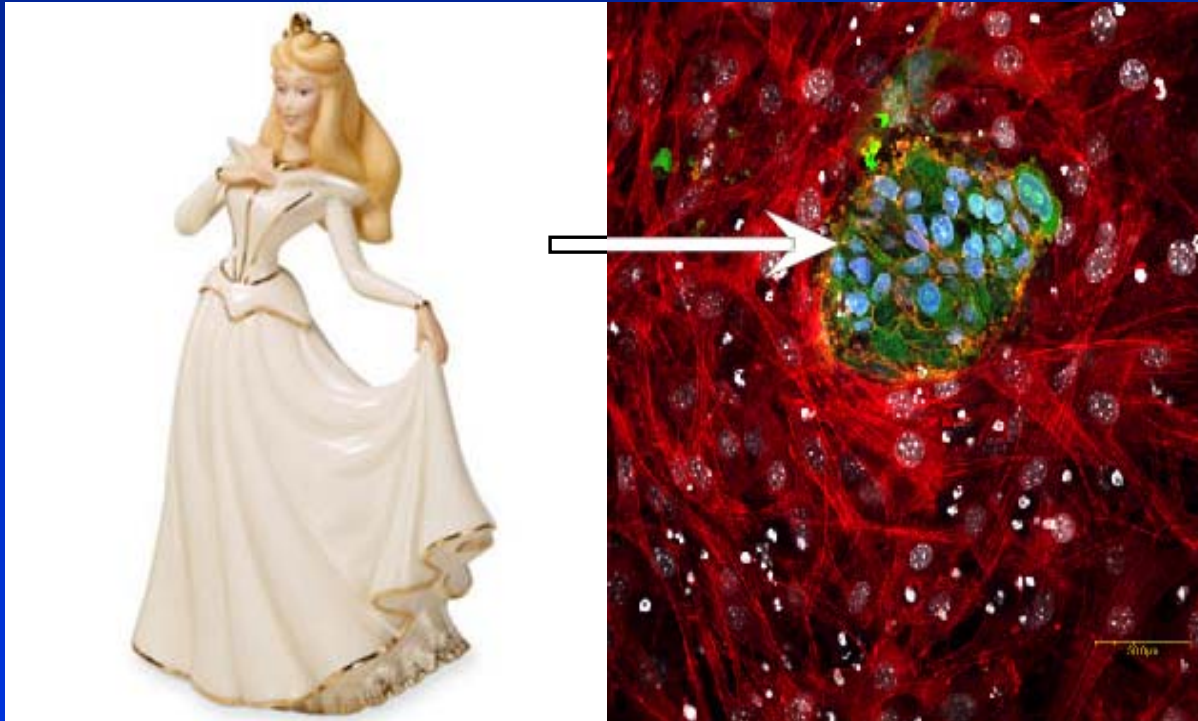
Az új hiperaktív SB100x transzpozáz aktivitása összemérhető a leghatékonyabb virális génbeviteli rendszerekkel.

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

<http://www.biotechniques.com/news/Sleeping-Beauty-named-Molecule-of-the-Year/biotechniques-187068.html?autnID¼191663>

**Kérdések...**

# Génbevitel humán embrionális őssejtekbe a *Sleeping Beauty* rendszerrel

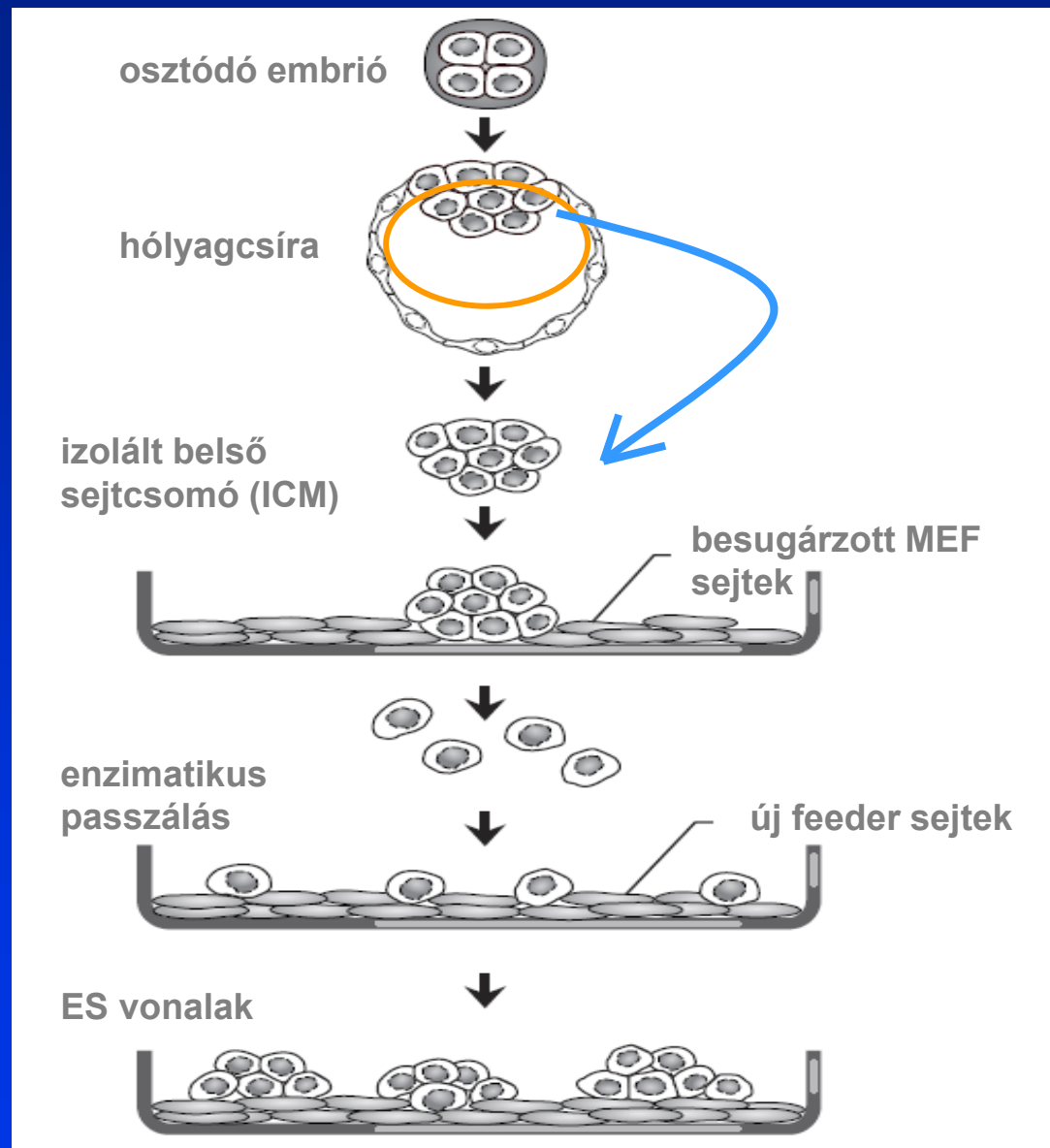


# A humán embrionális őssejtvonalak eredete

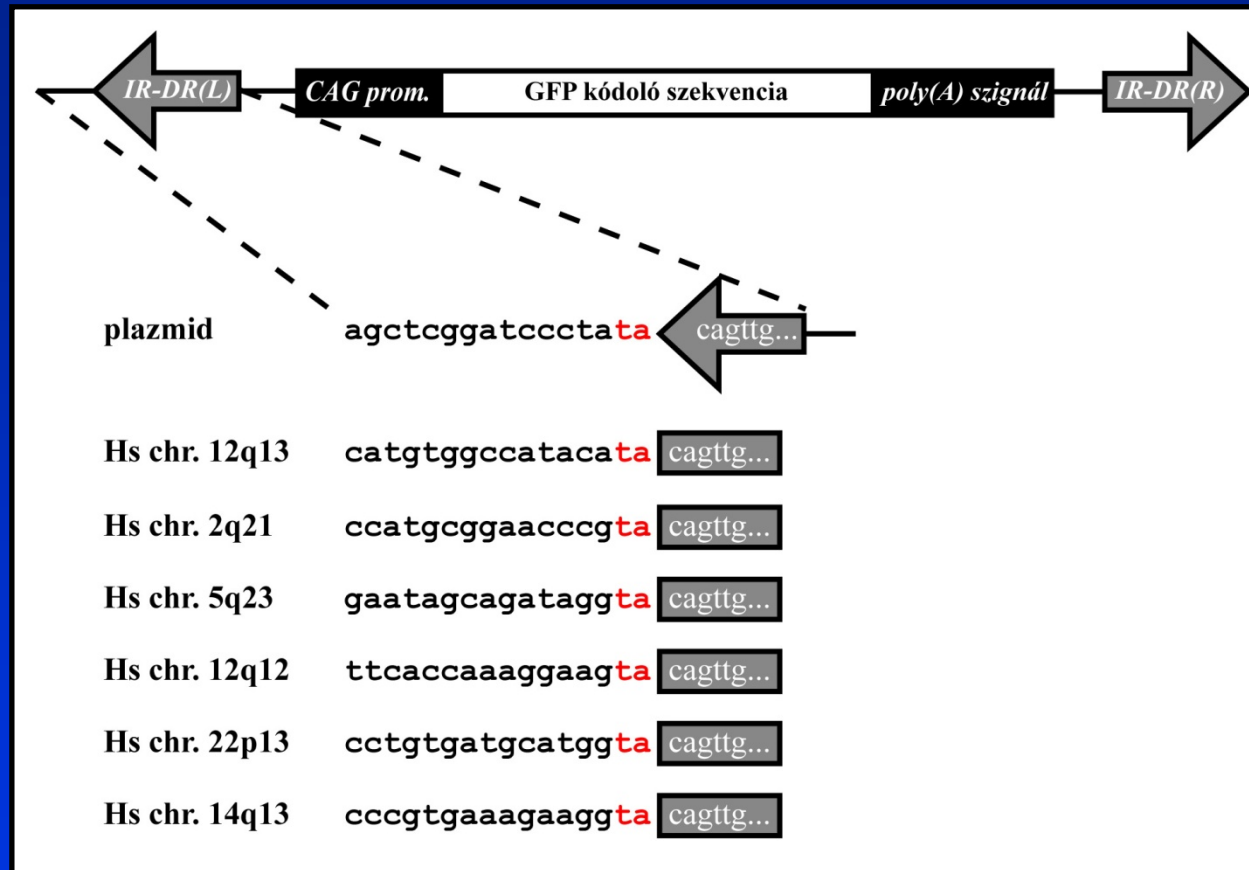
a hólyagcsíra állapotú embrióban már két eltérő fejlődési képességgel rendelkező sejtípus található

- belső sejtcsomó sejtjei
- trofoektoderma sejtek

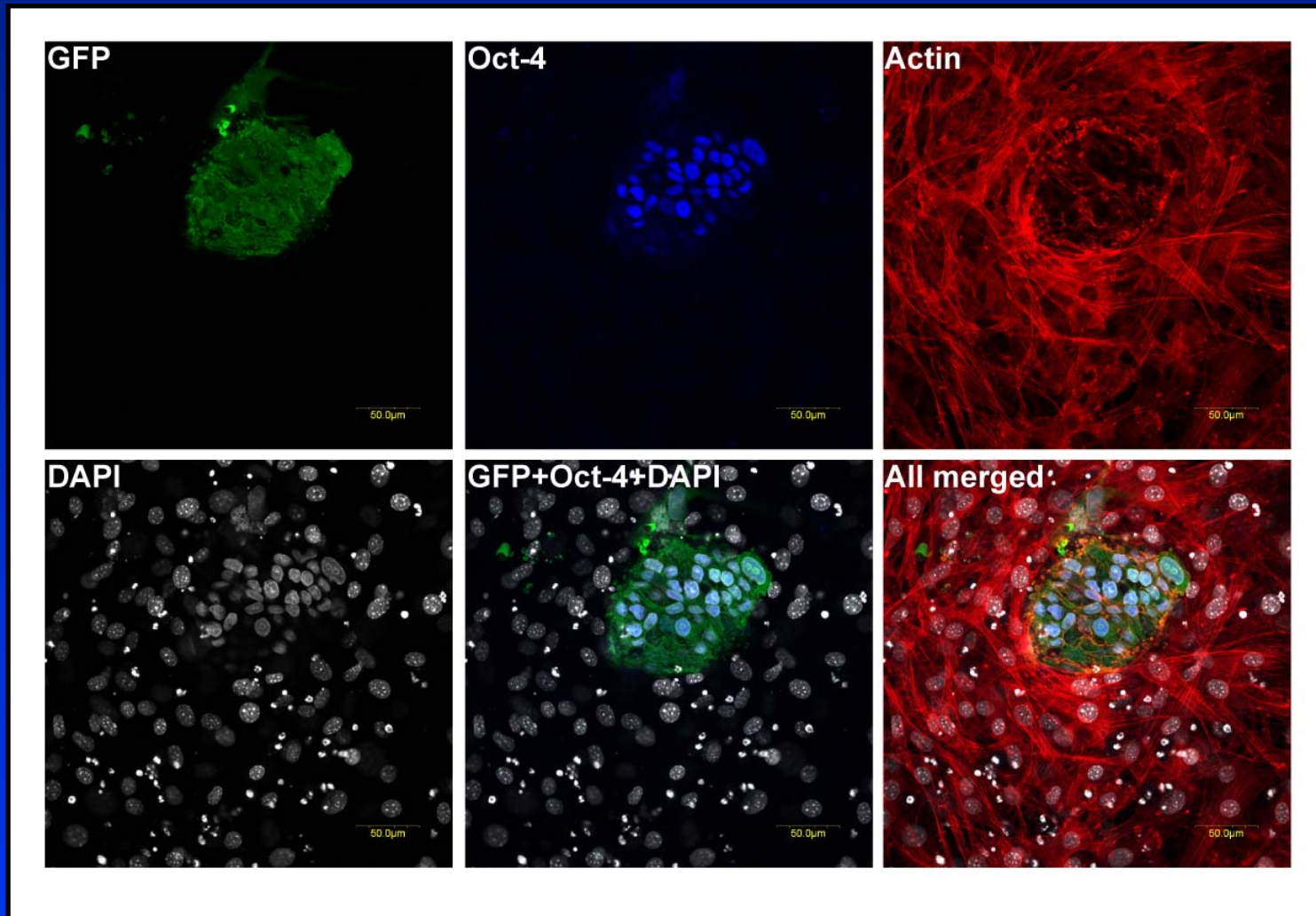
a belső sejtcsomó (ICM) sejtjeit tenyésztik tovább



# Bizonyíték a transzpozícióra: integrációs helyek



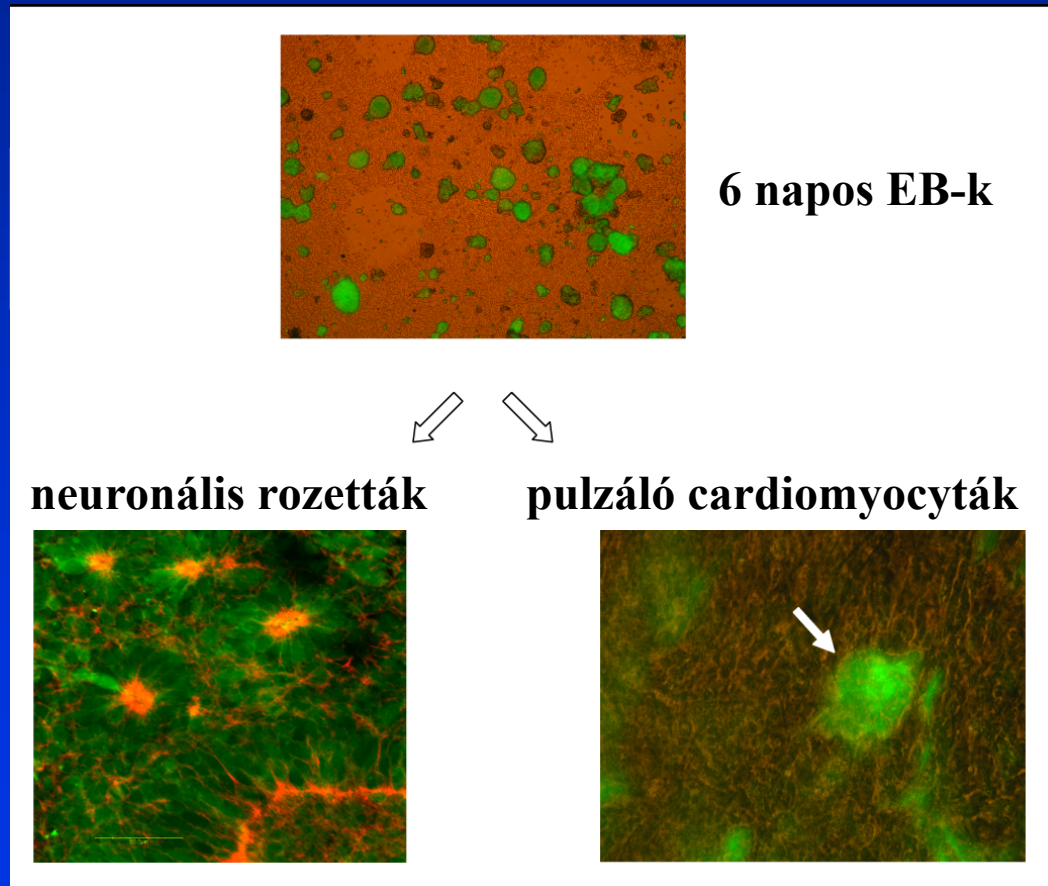
# GFP klónok pluripotenciája I. : Oct4 fehérje



*Orbán et al. (2009) Stem Cells*

# Őssejtklónok differenciációja

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

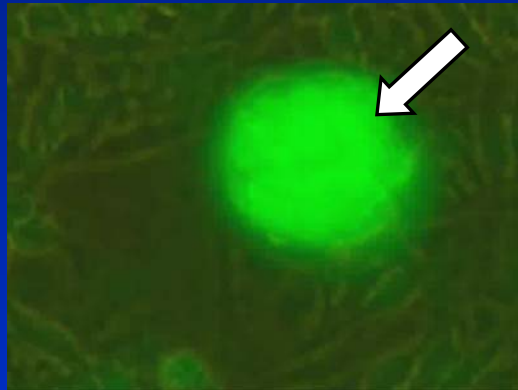


CAG promóter:  
erős transzgén expresszió  
a szívizomsejtekben ?!

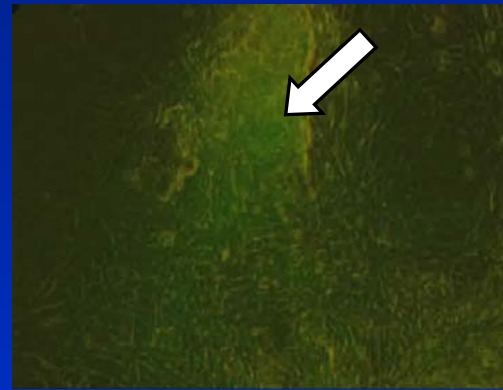


# Cardiomyocytá irányú differenciáció

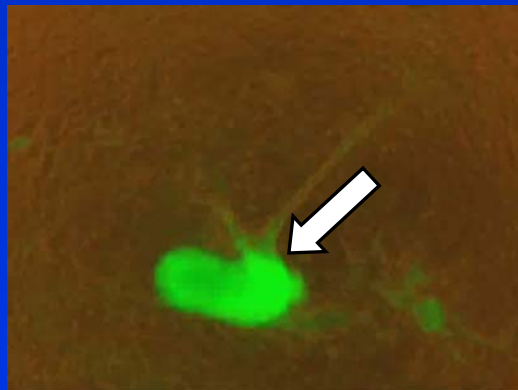
SB-CAG-GFP



SB-EF1 $\alpha$ -GFP



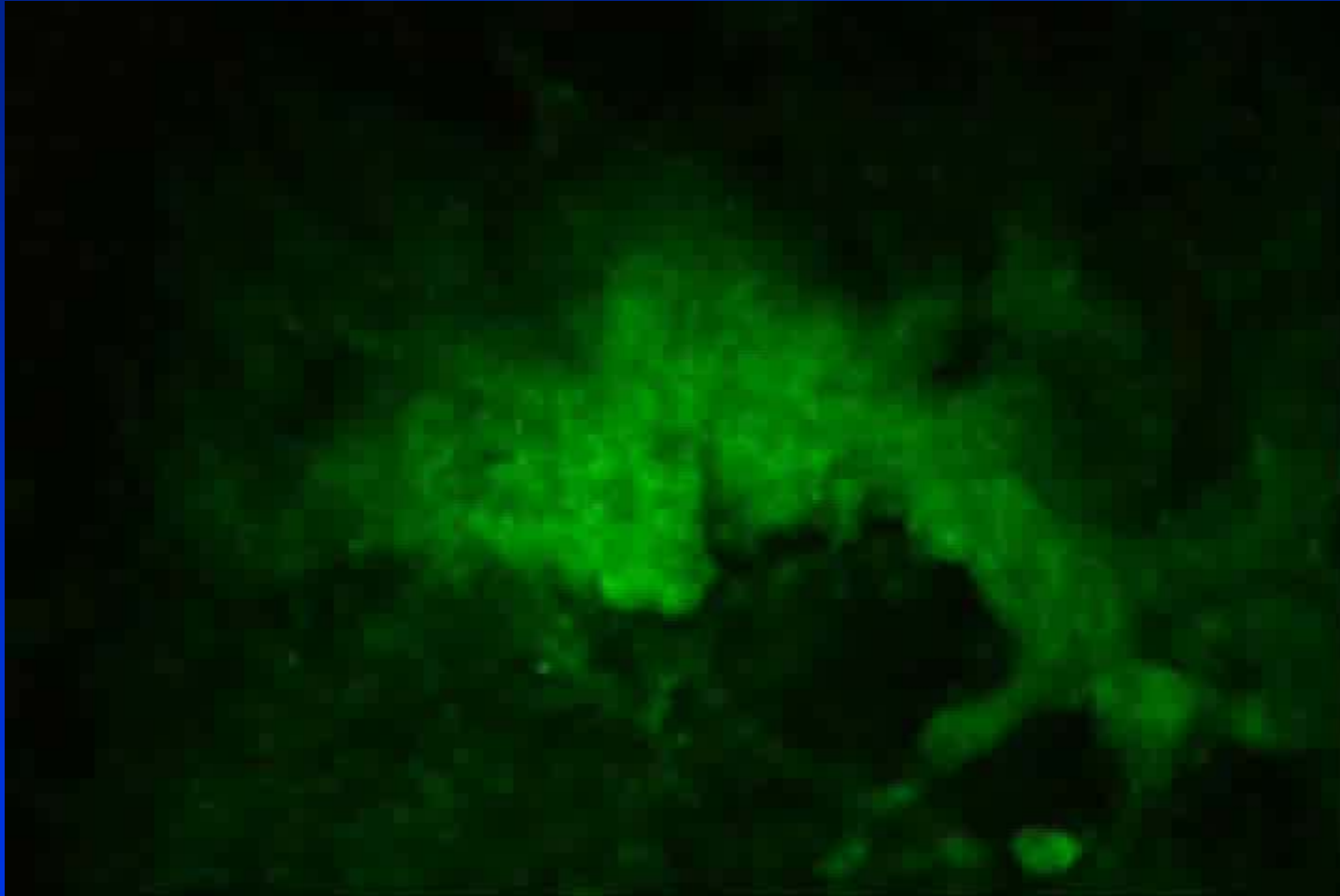
LV-CAG-GFP



LV-EF1 $\alpha$ -GFP



# Farmakológiai tesztelések

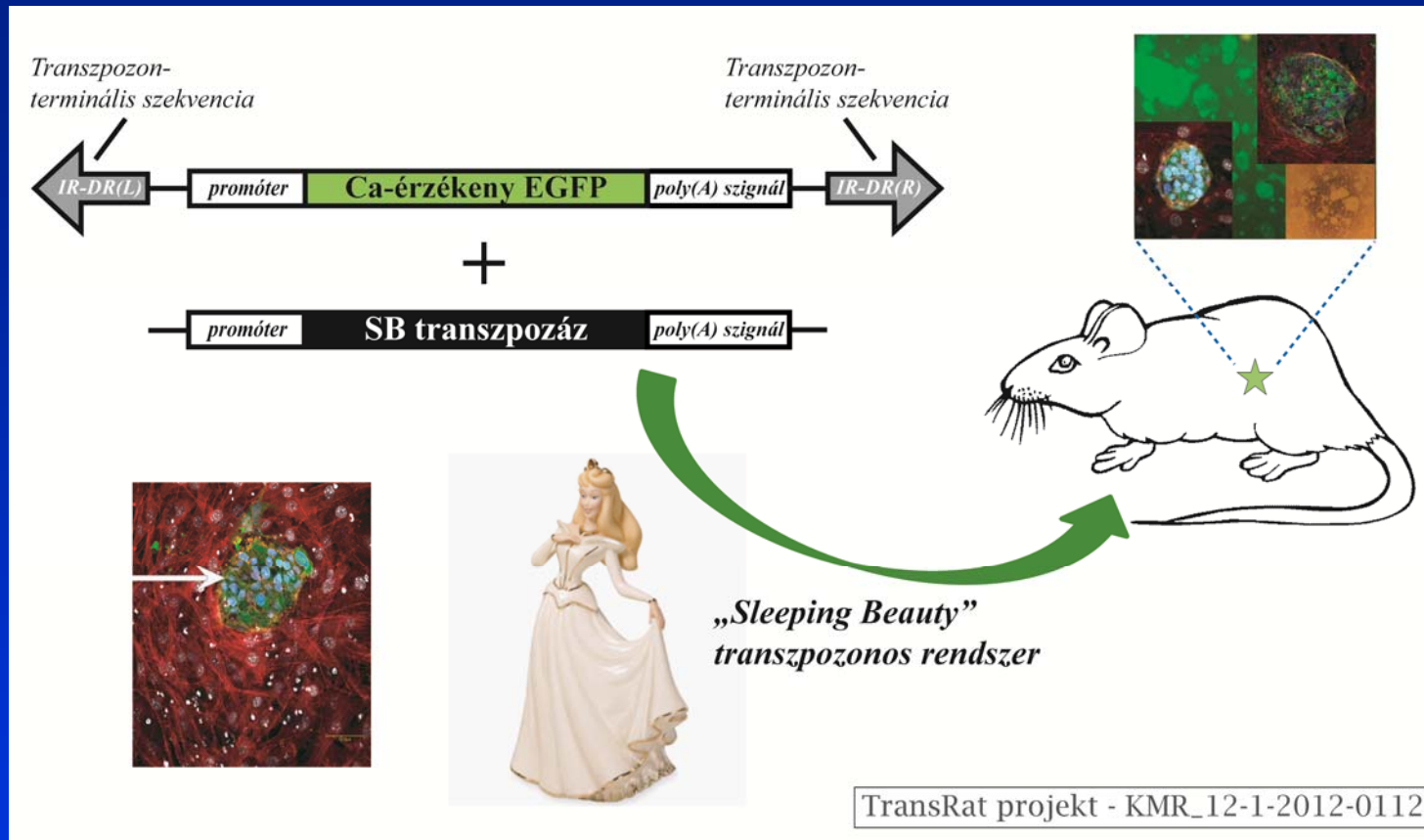


+adrenalin / +verapamil

*Orbán et al. (2009) Stem Cells*

**Kérdések...**

# Transzgenikus patkányok transzpozonokkal

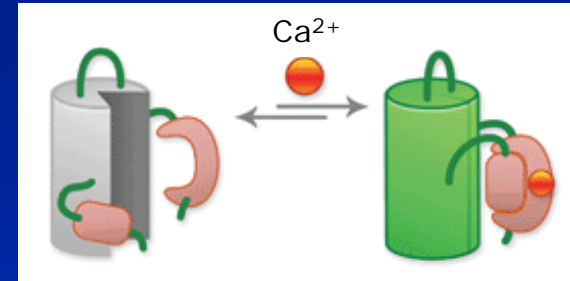
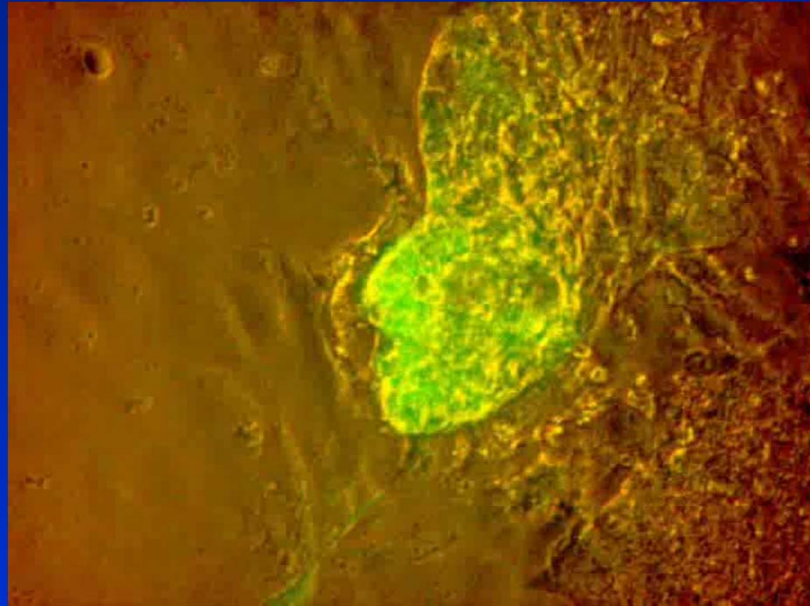


**CAG-GCaMP2 / rGFA-RGECO**

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

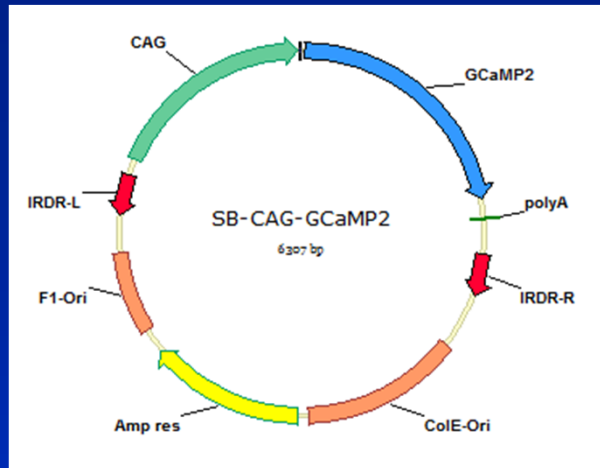
*Szebényi et al. (2015) Scientific Reports*

# Kalciumjelek GCaMP2-vel

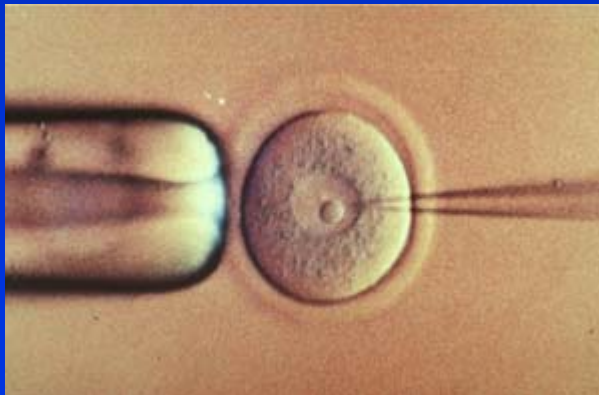


- GCaMP2:
- kalcium-szenzitív GFP
  - calmodulin domén beépítésével

# Transzgén mikroinjektálás



+ *SB100x* transzpozáz mRNS formájában



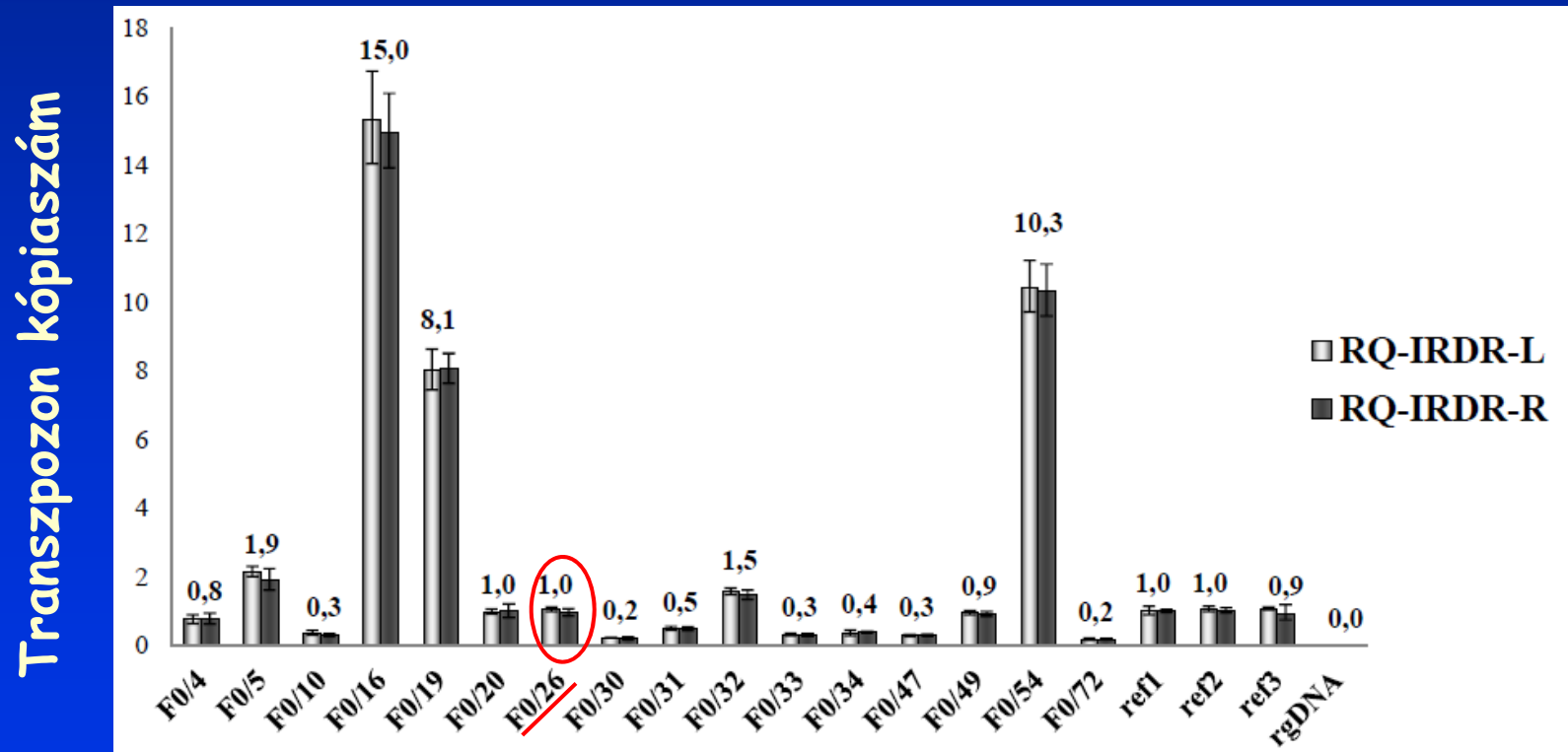
1. Mikroinjektálás az apai előmagba
2. Beültetés átlétes nőstényekbe
3. Megszületik az alapító (F0) generáció

(Sprague-Dawley törzsből származó petesejt Wistar nőstény recipiensekbe)

# F0 egyedek genetikai szűrése

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

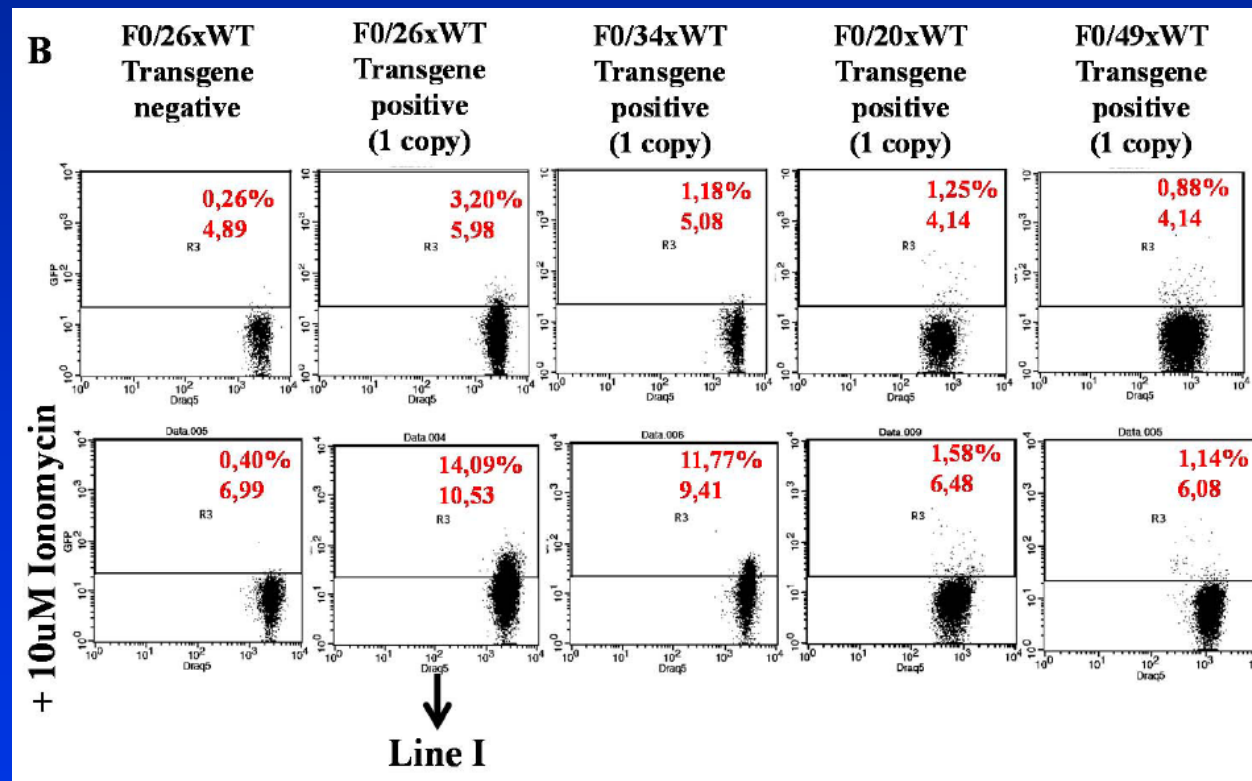
75 újszülöttből 16 hordozó → ~21%-os hatékonyság!



# 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

Ca<sup>2+</sup> szint ↑

GCaMP2 exp. ↑



## Stabil kétkópiás vonal létrehozása (haploid egykópiás)

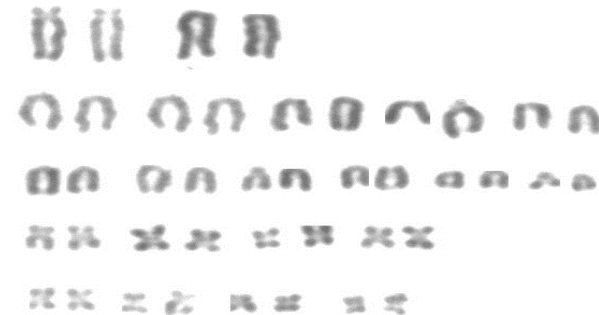
- Vad típussal keresztezés, „tisztázás”
- Heterozigóta egyedek keresztezése, beltenyésztés
- A vonal jellemzése: genetikai stabilitás, fenotípusos jellemzés:

stabil **kópiaszám (2)**  
és **integrációs hely**  
már 6 generáción keresztül

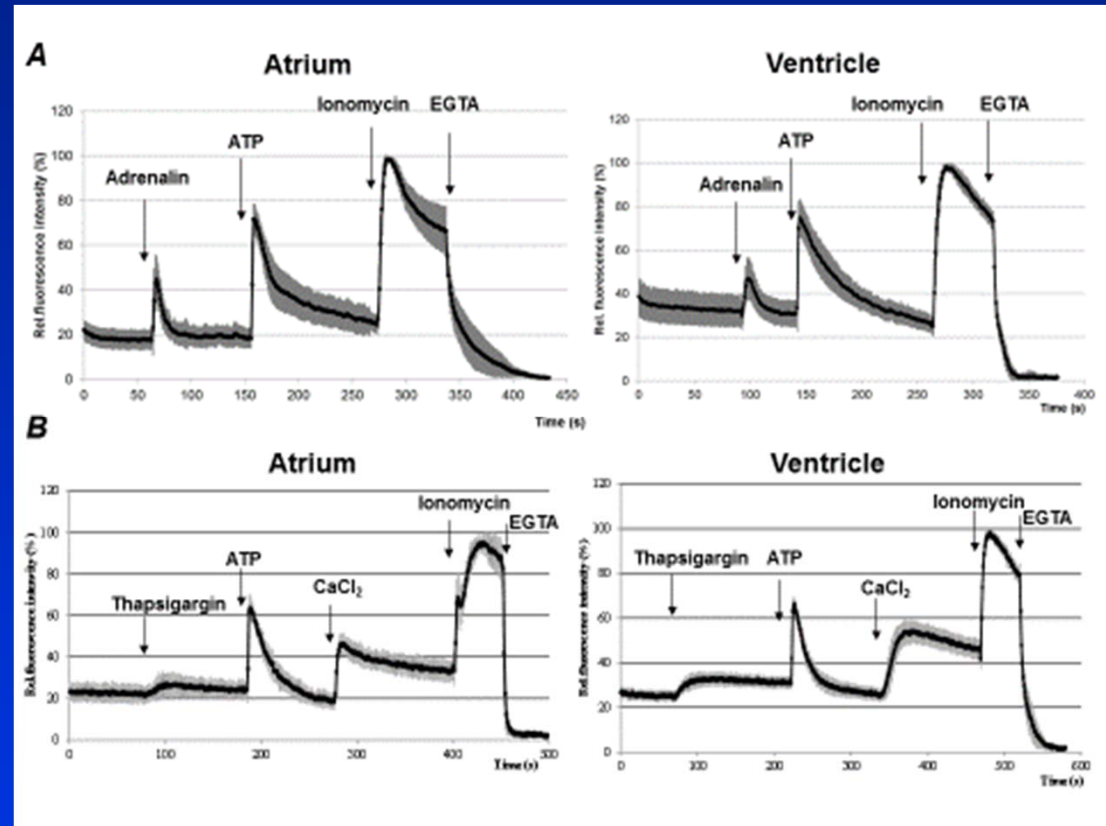
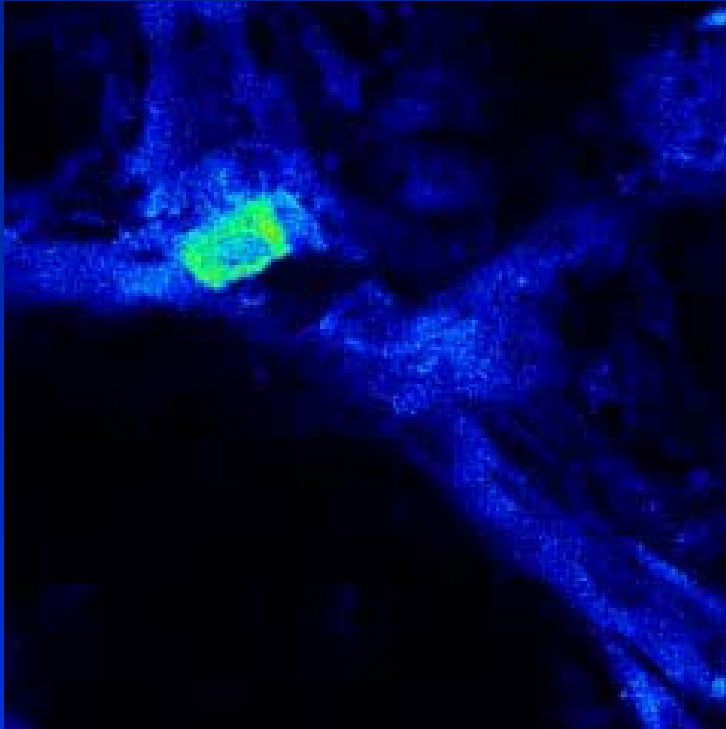
normális és stabil  
**kariotípus**  
(21 pár kromoszóma)

```
GGGACTAGGTTGGGCTAAGAGTGAAGACTCTTTAGC
TGTCGTTCTATGGCAATCCTGACAGGATTCCACTCCC
CTTGTAAGCAGGTACAGTTGAAGTCGGAAGTTTA
CATACACCTTAGCCAATCACTAGTGAATTCGCGGC
CGCCT
```

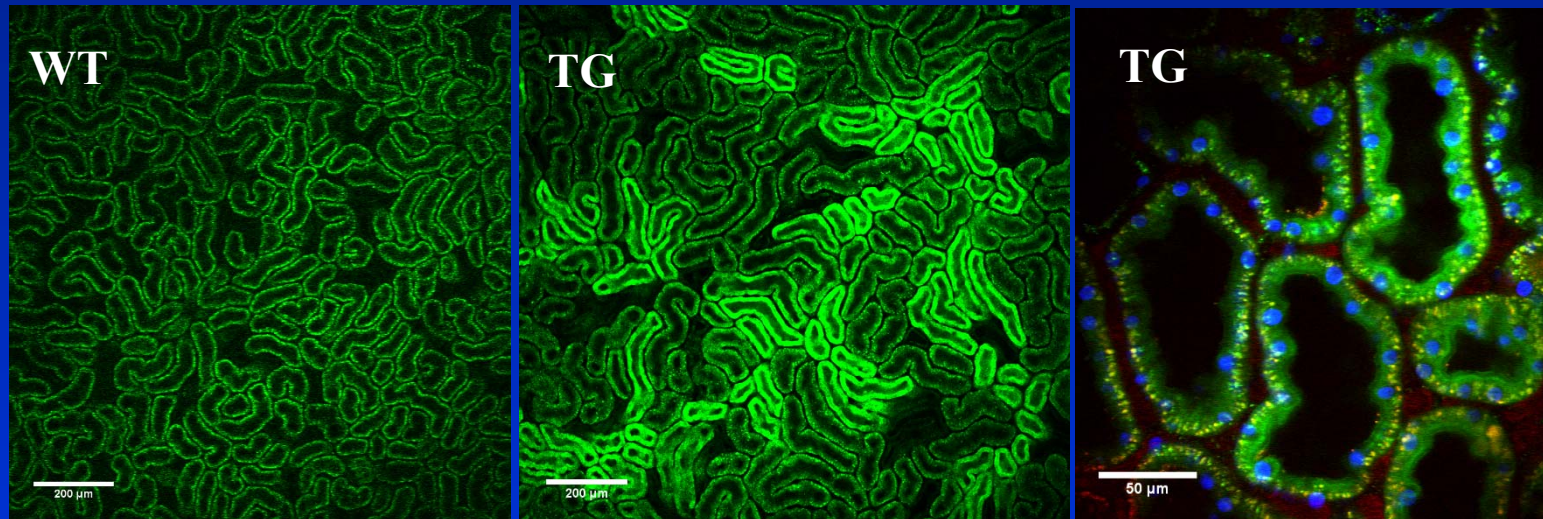
Line I. – *Sleeping Beauty* transposon integration locus  
in the rat genome/ Chromosome 9, intergenic region  
Ref. seq: NC\_005108.3, nucleotide position:78819834  
(**bold**: IRDR-R transposon sequence)



# Szív szeletek, *in vitro* kultúrák

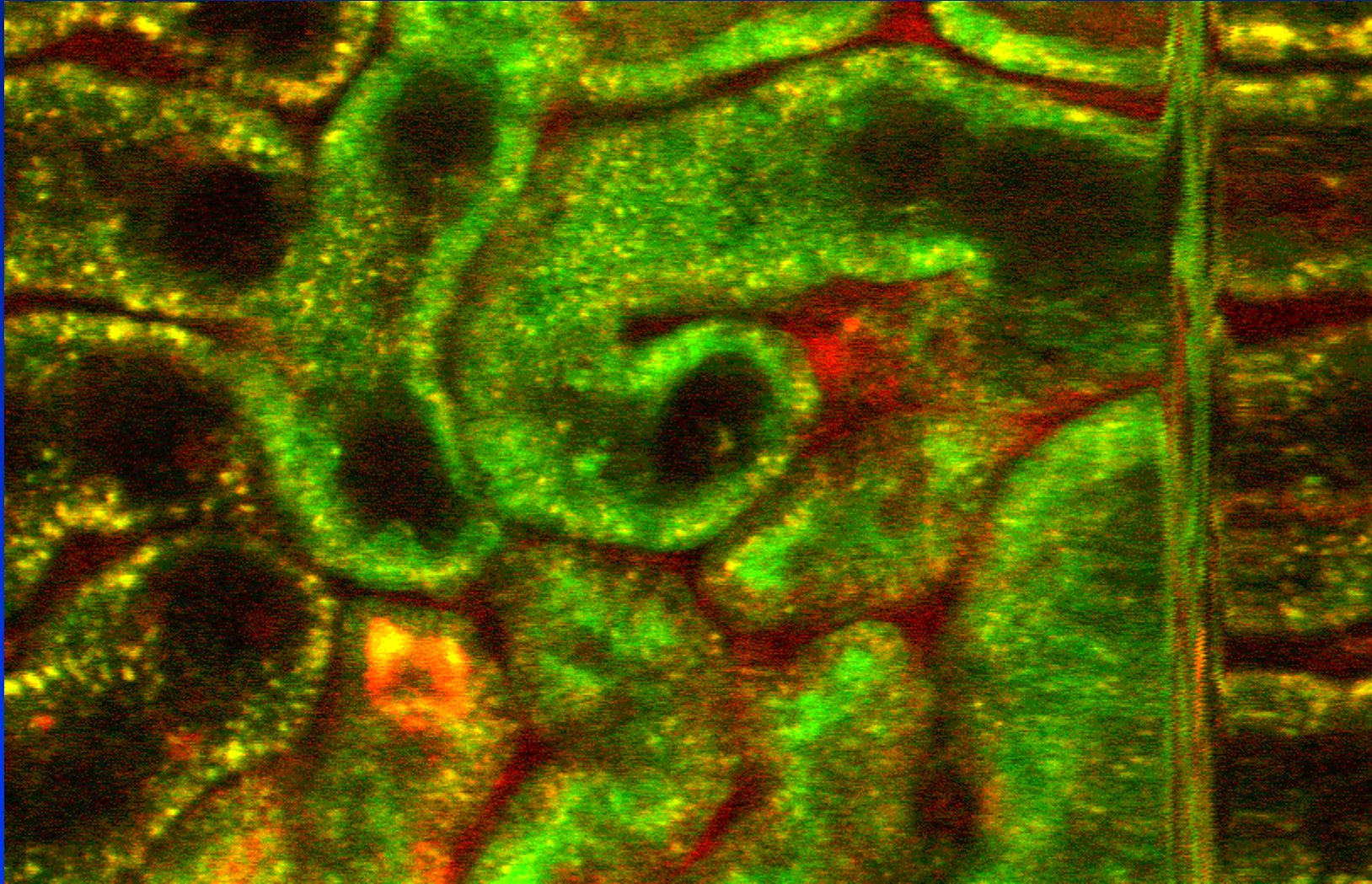


# A CAG-GCaMP2 $\text{Ca}^{2+}$ indikátor fehérje expressziója patkány vesében in vivo



Miért ennyire heterogén?

**A CAG-GCaMP2 Ca<sup>2+</sup> indikátor fehérje  
expressziója patkány vesében in vivo**



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

*rhodamine-dextrán konjugátum*

**Köszönöm a figyelmet!**