

DNS TRANSZPOZON ALAPÚ GÉNBEVITELI ELJÁRÁSOK VIZSGÁLATA EMLŐS RENDSZEREK BEN

Doktori értekezés

Kolacsek Orsolya

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
KLASSZIKUS ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKA DOKTORI PROGRAM



Doktori Iskola vezetője:

Dr. Erdei Anna, D.Sc.

Programvezető:

Dr. Vellai Tibor, D.Sc.

Témavezető:

Dr. Orbán Tamás, Ph.D.

Tudományos főmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont
Enzimológiai Intézet

Budapest

2016

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. Transzpozonok osztályozása és felépítése.....	7
2.2. Class I transzpozíciós mechanizmusok.....	10
2.2.1. LTR retrotranszpozonok.....	10
2.2.2. Non-LTR retrotranszpozonok (<i>LI</i>).....	11
2.3. Class II transzpozíciós mechanizmusok.....	13
2.3.1. Konjugatív elemek (S és Y rekombinázők).....	13
2.3.2. RC transzpozonok (IS91, <i>Helitronok</i>).....	15
2.3.3. DDE(D)-transzpozonok.....	17
2.4. Transzpozonok „életana”.....	23
2.6. Transzpozonok jelentősebb alkalmazásai.....	28
2.8. Génterápia.....	34
3. CÉLKITŰZÉSEK	39
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	40
4.1. Plazmid konstrukciók.....	40
4.2. Sejtenyésztések és sejtklónok létrehozása.....	41
4.3. Transzfekciók és transzpozíciós esszék.....	41
4.4. Derepresszálo kezelések – transzgén csendesítettség vizsgálata.....	43
4.5. FACS analízis és szortolás.....	43
4.6. qRT-PCR.....	44
4.7. Transzpozon kópiaszám meghatározás.....	45
4.8. Kvantitatív kivágási PCR.....	47
4.9. SB integrációs helyek meghatározása.....	48
4.10. Statisztika.....	50
5. EREDMÉNYEK	51
5.1. Transzgén expressziójának és csendesülésének vizsgálata SB transzpozonos rendszerrel transzfektált sejtpopuláción.....	51
5.2. Transzpozonos rendszer génbevitelben mutatott aktivitásának mérésére alkalmas módszerek beállítása.....	55
5.2.1. Integrálódott transzpozon egy sejtre jutó kópiaszámának mérése.....	55

5.2.2.	Transzpozon donor kivágódásának (<i>excízió</i>) mérése	61
5.3.	SB integrációs helyek meghatározása és karakterizálása	65
5.4.	Túltermeléses gátlás jelenségének vizsgálata és a génbevitel optimalizálása különböző sejteken a két leghatékonyabb rendszert illetően (SB és PB DNS transzpozonos rendszerek) ..	68
5.4.1.	Transzpozáz aktivitás jellemzése a kivágás kvantifikálásával	68
5.4.2.	Transzgenikus hatékonyság jellemzése.....	72
5.4.3.	Transzpozonos génbeviteli kísérletek átlagos kópiaszámának jellemzése	77
5.5.	Transzgénben alkalmazható néhány promóter összehasonlítása a génbevitelben.....	79
6.	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	83
6.1.	SB transzgén expressziójának és csendesülésének vizsgálata	83
6.2.	Transzpozáz aktivitás, valamint kópiaszám mérésére alkalmas módszerek	85
6.3.	SB integrációs helyek meghatározása és karakterizálása	86
6.4.	Túltermeléses gátlás	87
6.5.	SB és PB transzpozonos rendszerek hatékonyságvizsgálatai.....	89
6.6.	Transzgénben alkalmazható néhány promóter összehasonlítása a génbevitelben.....	92
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	95
8.	SUMMARY	96
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	97
10.	KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	98
10.1.	Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények.....	98
10.2.	Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények	98
11.	IRODALOMJEGYZÉK.....	99

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ASO: (*Assembly-Site Occlusion*)

Aza: 5-Aza-cytidine

CAG: kompozit promóter (*CMV enhancer – chicken β -actin – rabbit β_1 -globin*)

cDNS: RNS reverz transzkripciójával előállított DNS (*complementary DNA*)

CMV: citomegalovírus promótere

Ct: qPCR során mért fluoreszcencia küszöbérték, ciklusszám (*threshold cycle*)

Cre: Cre rekombináz

DDE(D): transzpozáz család katalitikus helyét kialakító aminosavak jelölése (*Asp, Asp, Glu(Asp)*)

DR: (*direct repeat*)

DSB: (*double stranded break*)

dsDNS: (*double stranded DNA*)

FACS: (*fluorescence-activated cell sorting*)

FLP: FLP rekombináz

for: (*forward*)

FRT: FLP rekombináz által processzálódó szekvencia

gDNS: genomiális DNS

GFP: (*green fluorescent protein*)

HEK-293: (*human embryonic kidney 293*)

HeLa: méhnyakrák sejtvonal (*Henrietta Lacks*)

HSC: (*hematopoietic stem cell*)

HUES9: (*human embryonic stem cell 9*)

hyPB: (*hyperactive PB*)

iPS: (*induced pluripotent stem cell*)

IS: (*insertion sequence*)

ITR: (*inverted terminal repeat*)

IRDR: (*inverted repeat direct repeat*)

IRDR-L: (*IRDR-Left*)

IRDR-R: (*IRDR-Right*)

kb: kilóbázis

LINE: (*long interspersed nucleotide elements*)

lox: Cre rekombináz által processzálódó szekvencia (*loxP*)

LTR: (*long terminal repeat*)

LI: (*LINE-1*)

MITE: (*miniature inverted-repeat transposable element*)

mp: másodperc

mPB: egérre kodonoptimalizált PB

NHEJ: (*nonhomologous end joining*)

OPI: (*overproduction inhibition*)

ORF: (*open reading frame*)

pA: elsődleges RNS transzkriptum terminációját és poliadenilációját kiváltó szignál (*polyA*)

PB: (*piggyBac*)

PBS: (*primer binding site*)

PCR: (*polymerase chain reaction*)

PEC: (*Paired End Complex*)

PGK: foszfo-glicerát kináz gén promótere

piRNS: Piwi fehérjével interaktáló kis RNS

POL: (*DNA polymerase*)

qPCR: (*quantitative PCR*)

qRT-PCR: (*quantitative reverse transcription PCR*)

RC: (*rolling-circle*)

rev: (*reverse*)

RT/En: (*reverse transcriptase / endonuclease*)

RNáz: ribonukleáz

RPPH1: RNáz P H1 RNS komponense

RQ: (*relative quantity*)

SB: (*Sleeping Beauty*)

SEC: (*Single End Complex*)

S-NEC: (*Synapsis by Naked End Capture*)

SV40: *simian virus 40* promótere

TSA: trichostatin A

TSD: (*target site duplication*)

V(D)J: (*variable diversity joining*)

3'UTR: (*3' untranslated region*)

5'UTR: (*5' untranslated region*)

1. BEVEZETÉS

A mozgó genetikai elemeket (vírusok, transzpozonok) sokáig a genom „parazitáinak” tekintették, hisz egyetlen céljuk önmaguk genetikai anyagának sokszorozása. A transzpozonok részletes tanulmányozása azonban rávilágított arra, hogy aktív kölcsönhatásuk a gazdagenommal olyan sikeresebb fajták evolválódását tette lehetővé, melyek fennmaradásuk érdekében kevésbé invazívak a genom számára, így hosszabb tartózkodásuk jelentősen formálhatja azt [1, 2]. Szemben a pontmutációkkal a transzpozonok nagyobb léptékű változásokat okoznak a genomban. Mivel a genomban több helyen előforduló homológ szekvenciákról lehet szó, aktivitásuktól függetlenül is formálják a genomot az egyenlőtlen (nem homológ kromoszómáriszek közötti) *crossing over*-nek köszönhetően. Utóbbi jelenség szerepet játszhat a kópiaszám variánsok (*copy number variations*) létrejöttében, ahol a kiindulási kópiát ismétlődő szekvenciák határolják [3-5]. A homológ rekombináció „tévedései” akár teljes kromoszómális átrendeződéseket is okozhatnak, melyekre először genetikai betegségek kapcsán derült fény [6].

Számos genom a transzpozonok végleges inaktivációja helyett expressziójuk csendesítésével védi a genom stabilitását [7]. A transzpozonok aktivitásának megtartása feltehetően evolúciós előnyt biztosít a gazdagenom számára. Az epigenetikai újraprogramozásnak köszönhetően csírasejtekben és embrionális őssejtekben, valamint emlősök esetén neurális progenitor sejtekben is aktiválódnak egy rövid időre [8-10]. Így nem csak a csíravonalas variabilitáshoz, de a szervezet mozaikosságához is hozzájárulnak [11, 12]. Élesztőben, növényekben és gyümölcsleányban stressz hatására aktiválódnak az egyébként csendesült formában jelen lévő transzpozon szekvenciák, ezáltal jelentős szerephez juthatnak az adaptálódásban [13-15]. Az emlős genom meglehetősen magas transzpozontartalma (45%) felveti azt a hipotézist, hogy a genom méretének a növekedésével együtt a speciációban is szerepük lehetett. Ezt alátámasztani látszik az a tény, hogy más genomok fiatalabb transzpozon szekvenciákat tartalmaznak, a régiek valószínűleg deletálódnak, ha a gazdaszervezet számára nincs előnyük [1, 16].

A transzpozonok jelentőségét növeli a domesztikáció jelensége. A gerincesek adaptív immunitása nem létezhetne az ellenanyag gének V(D)J rekombinációja nélkül, melynek mechanizmusa a DNS transzpozonok kivágási lépésével azonos, és domesztikálódott transzpozázok (RAG1/RAG2) végzik [17]. Telomeráz enzimünk reverz transzkriptáz aktivitással rendelkezik, és RNS templátot használ a kromoszómavégek replikációjának befejezéséhez [18]. A telomeráz transzpozon eredetét támasztja alá a gyümölcsleány telomerszerkezete, amely tandem retrotranszpozon elemekből áll, és amelyekről bebizonyították, hogy preferenciálisan oda

integrálódnak [19]. Számos transzpozáz struktúrájú fehérje ismert, melyeknek a sejtben betöltött funkciója részben vagy teljesen eltér az eredetitől [20]. Sokak szerepe még egyáltalán nem ismert.

A vírusok és transzpozonok genetikai eszközként való felhasználása forradalmasította a biológiai kutatásokat, mind a mutagenézis, mind a génbeviteli eljárásokban való alkalmazásuk kapcsán. Kiemelkedőek a funkcionális genetika, illetve a rákkutatás területén elért eredmények [21, 22]. A transzpozonok génterápiás alkalmazása gyógyíthatatlan betegségek kezeléséhez fűz nagy reményeket [23]. Doktori témám keretében a DNS transzpozonok génbeviteli alkalmazásának lehetőségeit és korlátait vizsgáltam emlős rendszerekben. Ebből kifolyólag, a teljesség igénye nélkül, dolgozatom a továbbiakban a transzpozonok tulajdonságaira és eszközként való használatukra fókuszál, különös tekintettel az eukarióta DNS transzpozonokra.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Transzpozonok osztályozása és felépítése

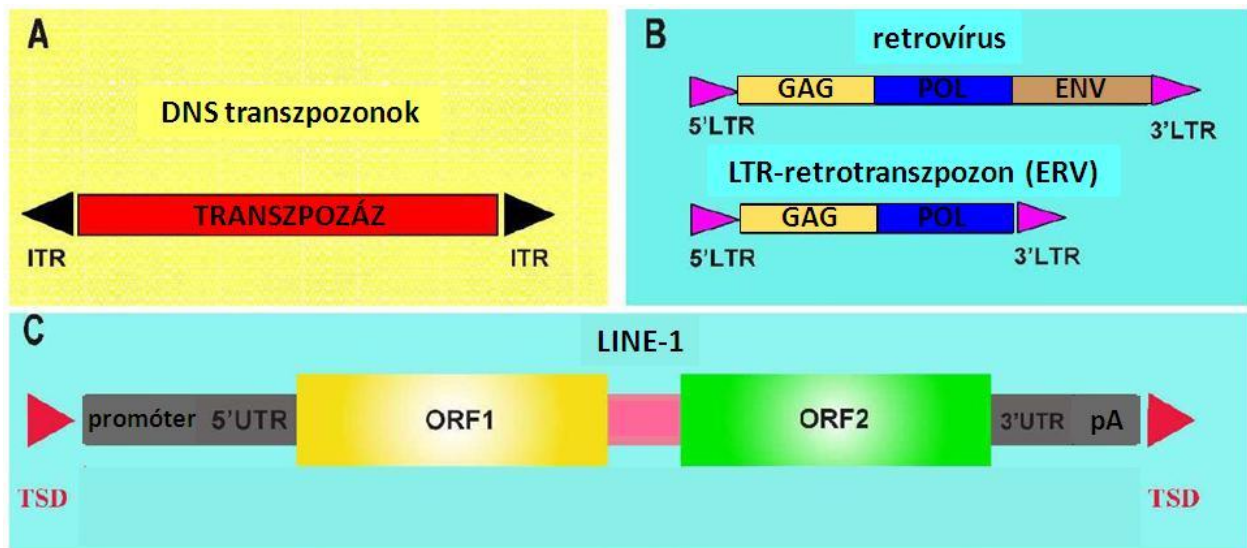
A transzpozíció köztes terméke alapján két nagyobb csoportot különböztetünk meg [8]. A retrotranszpozonok vagy „Class I” transzpozonok a DNS-ükről átírt RNS transzkriptumot igényelnek, és „copy and paste” (másolás és beillesztés) módon terjednek. Ennek megfelelően eredeti helyükön is megmaradnak. A retrotranszpozonok az integrációt megelőzően minden esetben átírják RNS-üket DNS-é. Ez a reverz transzkripció folyamata, amely specifikus enzimaktivitást igényel. A „Class II” csoportot képviselik a DNS transzpozonok, akik kizárólag DNS szubsztrátot igényelnek, és klasszikus képviselői „cut and paste” (kivágás és beillesztés) módon terjednek, így a transzpozíció végeredményét tekintve eredeti helyükön nem maradnak meg. Fontos megemlíteni, hogy a klasszikus DNS transzpozonokon kívül léteznek „copy and paste” módon terjedő DNS transzpozonok is, melyek a magasabb rendűekben kevésbé terjedtek el, ezért gyakran kihagyták őket a transzpozonok csoportosításából. A *Helitronok* újrafelfedezésével a replikatív (többszöröző) DNS transzpozonokat is „számon tartják”. Számos fiatal, következésképp nemrégiben aktív kópiájukat emlősökben (pl. denevérekben) is megtalálták [24]. A teljesség kedvéért tehát a DNS transzpozonok replikatív és nonreplikatív csoportokra oszthatók tovább.

A szekvenciális összetétel alapján megkülönböztetünk autonóm és nem autonóm transzpozonokat. Transzpozonnak tekinthető minden olyan DNS szakasz, amely mobilis genetikai elemként működhet. Az autonóm transzpozon DNS magába foglalja a mozgatásáért felelős minden elemet – a transzpozáz funkció elemeit is. Így ha újonnan kerül valamely naiv genomba,

ahol expresszálni (kifejeződni) is tud, önmagában képes biztosítani saját maga terjedését. A nem autonóm transzpozon önmagában nem képes mobilizálódni, viszont tartalmazza a transzpozonként való felismeréshez és a processzáshoz szükséges szekvenciákat. A nem autonóm elemek a transzpozícióhoz transz módon biztosított transzpozáz funkciót igényelnek.

A transzpozíciós mechanizmusokkal foglalkozó tudományos társadalom transzpozáz fehérje családok alapján csoportosítja a transzpozonokat 5-féle család megkülönböztetésével, ami további számtalan részben vagy teljesen különböző transzpozíciós mechanizmust különít el [25]. Legszámosabb család a DDE(D)-típusú transzpozázok családja, Asp-Asp-Glu(Asp) katalitikus centrummal rendelkezik [26], a klasszikus DNS transzpozonok nagy része ide tartozik (pl.: IS, Ac, P, Tc, *mariner*, hAT). A „cut and paste” DNS transzpozázok másik része a szerin (S) vagy a tirozin (Y) rekombináázok tagjai. Szinte kizárólag baktériumokban fordulnak elő, amely tudományterületen konjugatív elemekként szokták őket említeni [27]. Ide tartozik pl. az F plazmid, λ fág, és a P1 fág (Cre/*lox* rendszer). Az RC (*rolling-circle*) transzpozázok egyike a már említett *Helitron* család [28]. Az ötödik család különbözik a többi rekombinááz típusú transzpozáztól, mert tagjai reverz transzkriptáz, valamint endonukleáz aktivitások kombinációjával rendelkeznek (RT/En), és az általuk képviselt retrotranszpozonok a legelterjedtebbek például emlősökben. Jelen dolgozat csak a leggyakoribb, illetve legismertebb transzpozon típusokkal foglalkozik, nem kissebítve ezzel az élővilágban előforduló transzpozonok sokszínűségének jelentőségét.

Szekvenciális felépítésüket tekintve a klasszikus DDE(D)-típusú DNS transzpozonok mindkét végükön specifikus szekvenciákat (ITR – *inverted terminal repeat*) tartalmaznak, melyek a transzpozáz kötéséhez és a vágáshoz szükségesek (**1A ábra**). A végek között foglal helyet a transzpozáz enzim transzkripció egysége. Gyakran kettős *repeat*-ek jellemzők mindkét végén, melyek közül a belső *repeat* felelős az enzim felismeréséért és kötéséért, a külső pedig a vágás helyének meghatározására szolgál. Egyediség a DNS transzpozonok között, hogy az 5' nem transzlálódó (5'UTR) szekvencia tartalmazhatja a transzkripcióhoz szükséges promóter szekvenciát. Ennek hiányában csak abban az esetben tud kifejeződni a transzpozáz funkció, ha az integráció aktívan átíródó génbe vagy valamely promóter közelébe történik, kihasználva a gazdagén promóteraktivitását. A *piggyBac* család egyes tagjaiban *splice*-akceptor hely található közvetlenül a transzpozáz kódoló rész előtt, ami lehetővé teszi, hogy a génbe integrálódott transzpozon kódoló része bekerüljön egy érett mRNS-be [29]. Az ilyen promóter nélküli elemek esetén a génekbe történő integráció preferenciája is gyakran megfigyelhető.



1. ábra. Transzpozonok felépítése.

(A) Klasszikus DNS transzpozon a végeken specifikus felismerő szekvenciákkal (ITR – *inverted terminal repeat*), köztük a transzpozáz enzim transzkripció egysége. (B) LTR (*long terminal repeat*) retrotranszpozon és retrovírus szerkezete. (C) Non-LTR retrotranszpozonok egyik aktív képviselőjének a *LINE-1*-nek a szerkezete. Szerkezeti egységekről ld. bővebben a szövegben. (Bao, Biol Reprod, 2012, ábrája alapján.)

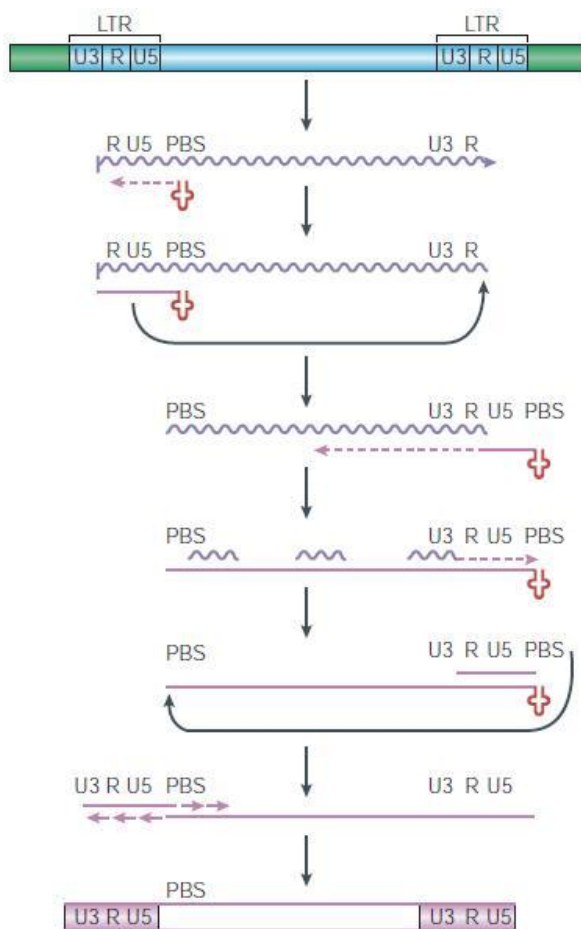
A retrotranszpozonok szerkezetét tekintve két jelentős családot tartanak számon. A víruszerű vagy más néven LTR (*long terminal repeat*) transzpozonok mindkét végükön LTR szekvenciát tartalmaznak (1B ábra). Endogén retrovírusként (ERV) is emlegetik őket, mivel szerkezetük és működésük a retrovírusokéhoz hasonló, azzal a különbséggel, hogy a sejtek közötti mozgás képességéért felelős gént (ENV – *envelope*) elvesztették [30]. A POL (*DNA-polymerase*) gén kódolja a reverz transzkriptázt, az integrázt (DDE(D)), valamint proteáz aktivitással is rendelkezik az egyben transzlálódó fehérje egységek processzáására. A GAG fehérje köti a vírus RNS-t, és víruszerű partikulumot képez a citoplazmában, ebben zajlik a reverz transzkripció.

Másik típusa a retrotranszpozonoknak – non-LTR retrotranszpozonok – fehérjekódoló génekhez hasonló struktúrát mutat az elején promóterrel, a végén pA (terminációs és poliadenilációs) szekvenciával (1C ábra). Legjelentősebb tagjaik a *LINE*-ok (*long interspersed nucleotide elements*) és *SINE*-ok (*short interspersed nucleotide elements*), melyek az emlős genom legnagyobb részét alkotják. A főemlősökben a *SINE*-ok többségét az *Alu* szekvenciák adják. A *SINE*-ok nem autonóm transzpozonok, a *LINE*-ok transzpozáz funkciója terjeszti őket. A *LINE-1* (*L1*) transzkriptum két ORF-et (*open reading frame*) tartalmaz, amely két különböző fehérje transzlációjáért felelős [31]. Az ORF1 feladata az RNS kötése, az ORF2 reverz transzkriptáz és endonukleáz aktivitással rendelkezik (RT/En típusú transzpozáz).

2.2. Class I transzpozíciós mechanizmusok

2.2.1. LTR retrotranszpozonok

Az LTR szekvenciának jelentős promóter aktivitása van. Ennek köszönhetően nem csak a transzpozon tartalom átírását iniciálhatja, hanem az integráció környezetében az endogén szekvenciák transzkripcióját is aktiválhatja [32]. Az LTR struktúra szekvenciálisan háromféle elemből épül fel [25]: U3 (*unique to the 3' end*) az RNS 3' végére jellemző szekvencia, R (*repeat*) szekvencia mely az RNS mindkét végén megtalálható, U5 (*unique to the 5' end*) az RNS 5' végére jellemző (2. ábra).



2. ábra. LTR retrotranszpozonok transzpozíciós mechanizmusa.

Celluláris tRNS két lépésben iniciálja a cDNS szintézist a transzpozon RNS templáton. Lépésekről ld. bővebben a szövegben. (Curcio, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003, ábrája alapján.)

Az RNS transzkriptum és a róla transzlálódó fehérjék víruspartikulumot alkotnak, amely egy celluláris tRNS-t (transzfer RNS) is magába zár. Utóbbi az RNS templáton két lépésben iniciálja a cDNS (komplementer DNS) szintézisét. Első lépésben a tRNS a transzpozon RNS 5' végére jellemző U5 szekvencia belsőoldalán elhelyezkedő PBS-hez (*primer binding site*) kötődik komplementer bázispárok segítségével. Ennek köszönhetően először az RNS 5' vége íródik át cDNS-é, melynek a végére az R szekvencia kerül. Ezt követően a reverz transzkriptáz (POL) RNáz-H aktivitása a hibrid duplex RNS szálát visszabontja, ennek eredményeként a cDNS elongátum R szekvenciája túlnyúló formában szabaddá válik, és a szekvencia komplementaritása miatt az RNS 3' végén található ugyanilyen traktushoz kötődik (2. ábra). Ez már lehetővé teszi, hogy az egész transzpozon RNS átíródhasson cDNS-é (második iniciációs lépés).

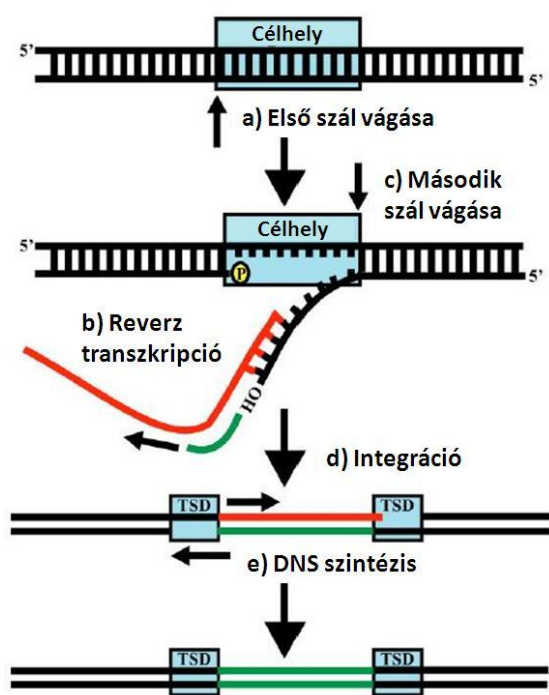
Az RNáz-H aktivitásnak köszönhetően az RNS-cDNS hibrid RNS komponense parciálisan degradálódik, majd a megmaradt közbülső RNS darabok valamelyikének 3'-OH vége elindítja a cDNS plusz szálának szintézisét, így a transzpozon 3' vége már dupla szálúvá válik. Ennek a végén a templátot már az a cDNS elongátum szolgáltatja, amely a tRNS első iniciációs lépésében lemásolta az U5 szekvenciát is. Így a cDNS plusz szálának végére U5 és PBS szekvencia kerül. Mivel az utóbbihoz a tRNS RNS komponense szolgáltatta a templátot, a hibridből ismét degradálódik az RNS, miközben túlnyúló formában szabaddá válik a transzpozon 3' végén a PBS szekvencia. Végül ez a túlnyúló vég komplementer bázispárok képzésével a másik oldali egyszálas véghez kapcsolódik, ami templátot szolgáltat az egyes DNS szálak 3' végeinek elongációjához, így mindkét irányban megszintetizálódik a teljes dupla szálas transzpozon DNS. A bonyolult folyamat eredményeként mindkét végre rákerül az LTR szekvencia (**2. ábra**). A tRNS második iniciációs lépése, valamint a két DNS vég kapcsolódása átmeneti kovalens kötés nélküli cirkuláris formában zajlik, a 2. ábra az érthetőség kedvéért lineáris formában ábrázolja az eseményeket.

Az LTR retrotranszpozonok integrációja a DNS transzpozonokhoz (DDE(D)) hasonló módon zajlik a POL fehérje integráz aktivitásának köszönhetően, melynek eredményeként a célszekvencia néhány nukleotidos ismétlődése (TSD – *target site duplication*) figyelhető meg a transzpozon integráció mindkét oldalán [25, 33]. A folyamatot a DNS transzpozonok transzpozíciós mechanizmusának leírása részletezi. Az LTR retrotranszpozonok mutagén potenciálja az inzerció helyének szekvenciális „átalakításában” rejlik. A retrotranszpozonok dupla szálas DNS (dsDNS) formájában történő integrációjának létezik olyan formája is, amely különbözik a DNS transzpozonokra szintén jellemző DDE(D) típusú integrációtól. Az Y rekombinázorok (ld. 2.3.1 fejezet) reverz transzkriptáz aktivitással rendelkező tagjai tartoznak ide (pl. DIRS1 család). Ennek során kovalensen folytonos cirkuláris dsDNS intermedier integrálódik, mely nem tartalmaz LTR szekvenciát [25, 34]. Képviselőiket egysejtűekben, illetve férgekben találták meg, kevésbé elterjedtek.

2.2.2. Non-LTR retrotranszpozonok (LI)

A non-LTR retrotranszpozonok 5'UTR-ében található promóternek köszönhetően az RNS polimeráz II átírja a transzpozont mRNS-é. A transzkriptum normál módon processzálódik és kerül ki a citoplazmába, ahol a bicisztronos mRNS-ről két fehérje transzlálódik. Az ORF1 és ORF2 az mRNS-sel ribonukleoprotein (RNP) komplexet képez a citoplazmában. Az ORF1 elsődleges feladata, hogy a saját mRNS-ét közvetlenül a transzlációját követően megkösse.

Trimer formájában kötődik a teljes mRNS-hez, így chaperonként is funkcionál, növelve annak stabilitását. Az ORF1 cisz-preferenciát mutat a saját RNS-éhez, így az egyéb celluláris mRNS-ek, valamint nem autonóm elemek retrotranszpozíciója limitált. Nem tisztázott pontosan, hogyan kerül be a sejtmagba az RNP, ahol az ORF1 már gyakran nem mutatható ki [31]. Az *LI* kizárólag osztódó sejtekben képes a transzpozícióra [35], ezért elképzelhető, hogy a sejtmag átmeneti disszociációja biztosítja a genomiális DNS (gDNS) hozzáférhetőségét. A sejtmagban a cél DNS helyén kapcsolatos zajlik az integráció és a reverz transzkripció, melyet célhely iniciálta reverz transzkripcióként említenek (TPRT – *target-primed reverse transcription*) [36]. Ennek első lépéseként az ORF2 endonukleáz aktivitásának köszönhetően elvágja egy T-ben gazdag cél DNS szekvencia oligoT-t tartalmazó szálát (3. ábra).



3. ábra. Non-LTR retrotranszpozonok transzpozíciós mechanizmusa.

A cél DNS helyén kapcsolatos zajlik az integráció és a reverz transzkripció (célhely iniciálta reverz transzkripció – TPRT). (Ostertag, Annual Review of Genetics, 2001, ábrája alapján.)

A keletkezett „nick” (hasítás a dsDNS egyik szálán) lehetővé teszi, hogy az RNS polyA vége komplementer bázispárok képzésével kapcsolódjon a DNS szál oligoT szekvenciájával. A folyamat DNS *primer*-t (3'-OH vég az egyszálas templáton) szolgáltat az *LI* RNS reverz transzkripciójához. A cél DNS másik szálának vágása eltolt, tehát nem ugyanott történik, ahol az első. A folyamat befejező lépései nem teljesen tisztázottak. A cDNS 3'-OH vége integrálódik a célhelyre a gDNS másik dupla szálú végének megfelelő szálához kapcsolódva. Az RNS eltávolításával a javító rendszer helyreállítja a cDNS komplementer szálát a célhelyen. A cél DNS eltolt hasítását magába foglaló szekvencia a transzpozon integráció mindkét oldalán megtalálható (TSD).

Gyakori jelenség, hogy az integrációk többsége a transzpozon 5' végén csonkolt és az ORF1 kódoló rész teljesen vagy részben hiányzik. Az *LI* transzpozonok átlagos hossza 1 kb (kilobázis), ami hatoda a teljes *LI* méretének [16]. A reverz transzkripció minden bizonnyal nem fut végig az RNS templáton, így az új integrációk többsége nem eredményez autonóm

transzpozont, hisz a transzpozon mRNS fogvatartásához az ORF1 fehérje szükséges. A csonkolt integráció valószínűsíthető oka, hogy a célhelyen a másik DNS szál vágása a reverz transzkripció befejezése előtt megtörténik, amely az integráció idő előtti befejezését indukálhatja.

Az *LI* aktivitás csillapításának egy másik oka, hogy az endogén *LI* kódoló elemek transzkripciós elongációja meglehetősen lassú, még a legaktívabb *LI* kópiák esetében is [37]. Ezek sejtenyészetben alkalmazott mesterségesen magas szintű expressziója sem eredményez jól detektálható RNS-t és fehérjét. Bármely kódoló génbe kísérletesen beillesztve az *LI* ORF-eket, annak transzkripciója szignifikánsan csökken az *LI* orientációjától függetlenül, mely statisztikusan is igazolható *in vivo*. Szignifikánsan több az *LI* inzerció az alacsonyabb szinten expresszáló génekben, mint azokban, melyek expressziója magas [37].

A non-LTR retrotranszpozonok mutagén potenciálja nem csak az inzerció helyének mutagenézisében rejlik, transzdukáló képességük is jelentős. A transzkripció esetenként nem terminálódik a pA szignál által meghatározott módon, így celluláris szekvenciák is átíródnak a retrotranszpozon mRNS-ébe. Ezek a hosszabb-rövidebb genomiális szakaszok így más lókuszt kerülnék a genomban. Az *LI* inzerciók 20%-a tartalmaz 3' oldali transzdukált szekvenciát [38]. Ilyen módon egyes gének akár új exonokra is szert tehetnek (*exon shuffling*), de számos példát találtak szabályozó szekvenciák pl. promóterek *shuffling*-jára is.

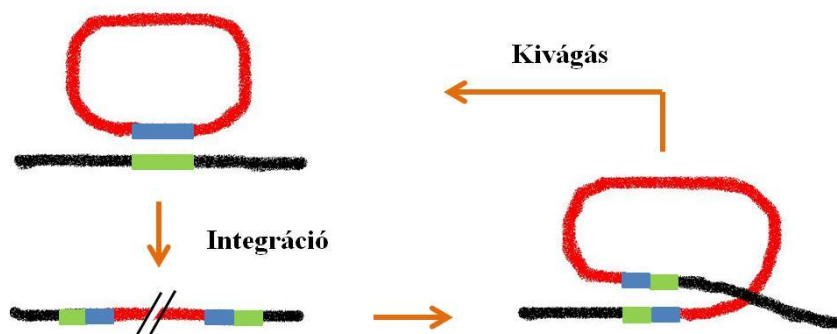
2.3. Class II transzpozíciós mechanizmusok

2.3.1. Konjugatív elemek (S és Y rekombinázorok)

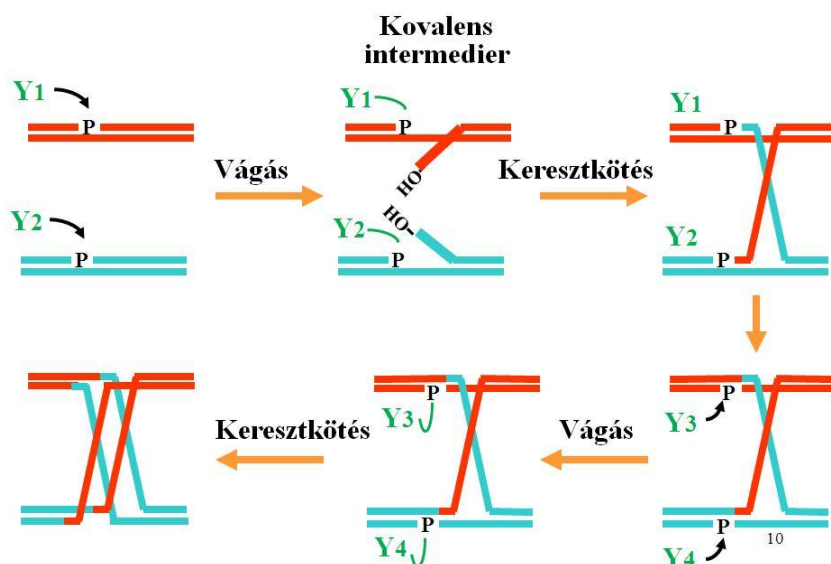
A konjugatív elemek olyan „cut and paste” típusú DNS transzpozonok, melyek hosszabb-rövidebb ideig kovalensen folytonos cirkuláris formában vannak jelen a prokarióta sejtben. A konjugatív elnevezés onnan ered, hogy gyakran az egyik sejtből a másikba történő átjutást is lehetővé teszik [27]. Helyspecifikus rekombinációjuk mind a donor- mind a célhelyen specifikus szekvenciákat igényel, melyeket a rekombinázorok felismernek és kötnek (**4A ábra**). Ezek a szekvenciák homológok, és csak abban az esetben katalizálnak integrációt, ha különböző molekulán vannak, illetve abban az esetben vágódnak ki, ha azonos molekulán találhatók. Az S és Y rekombinázorok a reakció során minden esetben kovalensen kötik valamelyik DNS szál végét. A dsDNS *nick*-elésével kapcsolatban az S rekombinázorok esetén foszfo-szerin, az Y rekombinázorok esetén foszfo-tirozin kötés jön létre (**4B ábra**). A donor- és a célhelyen kötött rekombinázorok dimerizációjával (szinapszis) a szerin, illetve a tirozin átadja a DNS véget a másik helyen szabadon álló DNS végnek (transz-észterifikáció vagy *strand transfer*). A komplementer DNS

szál donor-cél keresztükötése hasonlóan zajlik, az S rekombinázők esetén egyidejűleg-, az Y rekombinázők esetén egymást követően valósul meg. Az összesen négy DNS szál processzálásában négy transzpozáz monomer vesz részt, melynek eredményeként nincs TSD.

A



B



4. ábra. Konjugatív elemek transzpozíciós mechanizmusa.

(A) Konjugatív elemek helyspecifikus integrációja és kivágása. (B) Tirozin rekombinázők működési mechanizmusa. Lépésekről ld. bővebben a szövegben. (Semsey Szabolcs Géntechnológia című előadásábrája alapján.)

Érdemes megemlíteni, hogy néhányan megkülönböztetik a transzpozázokat a rekombinázőktól, melyek ugyanilyen mechanizmussal integrálódnak és vágódnak ki azzal a különbséggel, hogy a transzpozázok különböző célhelyekre is képesek integrálódni gazdasejtől függően [25]. Ezzel ellentétben a rekombinázők szekvenciahomológiát igényelnek a donor- és célhely közepén (*core* régió), melyek között a bázispárosodás kruciális az integráció és kivágás

szempontjából [39]. Ezen a részen eltoltan megy végbe a két szál hasítása. Szűkebb értelemben tehát a DNS transzpozíció olyan rekombináció, amely nem homológ szekvenciák között jön létre. Ebben az értelemben nem tekintendő transzpozonnak a Cre/*lox*- vagy az FLP/*FRT* rendszer sem, viszont számos technikai újítás és tudományos eredmény fűződik az alkalmazásukhoz [40], melyet a heterológ rendszerekben való működőképesség tesz lehetővé.

2.3.2. RC transzpozonok (IS91, *Helitronok*)

A replikatív DNS transzpozonok eukariótákban is előforduló képviselői az RC transzpozonok [41]. Az RC transzpozázok – más néven Y2 transzpozázok – az S és Y rekombinációkhoz hasonlóan kovalensen kötik a DNS egyik szálának végét, és az aktív centrumban két tirozint tartalmaznak, melyeket 3 aminosav választ el egymástól. A replikatív DNS transzpozíció lényege, hogy mind a donor- mind a célhelyen kialakult kópia esetén az egyik DNS-szál újonnan szintetizálódik a folyamat során, melyhez a gazdasejt DNS replikációs apparátusa is szükséges, viszont a transzpozáz fehérje képes annak iniciálására.

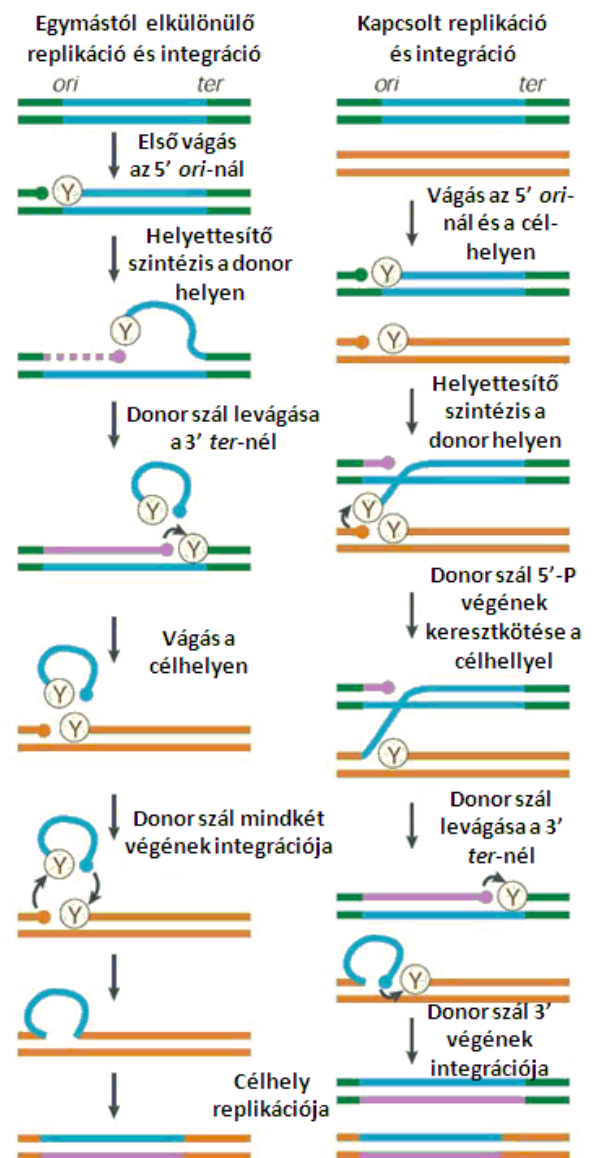
A replikációt minden esetben egy endonukleolitikus hasítás előzi meg a transzpozon 5' végén, mely 3'-OH véget szolgáltat a replikációhoz a donor helyen. A vágatlan transzpozon DNS szál pedig templátként funkcionál. A transzpozáz a *nick*-elést követően a vágott DNS szál végén az 5'-foszfát csoportot köti. A folyamat hasonló a plazmidok és fágok replikációjához, így az RC transzpozázok feltehetően bakteriális eredetűek. Ezt a transzpozon csoportot viszonylag nem régen azonosították, melyet az is nehezített, hogy nincsenek ITR-ek sem TSD-k. A transzpozon végek különböznek, melyek közül az 5' vég konzervált elemeket tartalmaz [42]. Ezek a konzervált elemek megtalálhatók az RC plazmidok és fágok „origin” régiójában is, mely a replikáció elindításának helyét jelöli. A 3' vég pedig „hairpin” struktúrát tartalmaz, melynek a prokariótákban fehérjekötő funkciója van, és a replikáció terminálására képes. (A hairpin struktúrát fordítottan komplementer szekvencia – palindrom – alakítja ki, mely képes a szálon belüli komplementarizációra.) Az RC transzpozonok végei tehát 5'ori – replikációt kezdő – és 3'ter – replikációt termináló – funkciót látnak el.

A bakteriofág ϕ x174 replikája hasonló konzervált katalitikus centrummal rendelkezik, mely csak egyszálas DNS hasítására képes [43]. Részletesen tanulmányozott RC mechanizmusa során az első tirozin által előidézett vágás iniciálja a replikációt, a második tirozin pedig terminálja a replikációt azzal, hogy a leváló egyszálas DNS-t levágja a donor helyről miközben cirkularizálja azt. Az IS91 transzpozon esetén is kimutattak egyszálas cirkuláris DNS-t *in vivo* [44].

Az egyik transzpozíciós modell alapján tehát a replikáció és az integráció elkülönülten zajlik egyszálas cirkuláris átmeneti formát képezve (**5. ábra, bal panel**). Ezt a modellt támasztja alá denevérből konszenzus alapján helyreállított *Helitron* szekvencia (*Helraiser*) kísérletes tanulmányozása is [45]. A másik modell esetén a replikáció és az integráció kapcsolatosan történik (**5. ábra, jobb panel**). A transzpozáz még a replikáció közben átköti az 5' DNS véget a célhelyre az ott előidézett vágásnak köszönhetően (második tirozin feltételezett funkciója), ebben az esetben nincs egyszálas cirkuláris átmeneti termék [42]. Mindkét modellben a célhelyen csak az egyik szálon történik vágás és integráció.

Nem teljesen tisztázott, hogy a célhely *nick*-elését ugyanazon transzpozáz végzi, vagy a szinapszis mindkét helyen kötött transzpozázok dimerizációjával jön létre. Például az IS91 a célhelyen néhány nukleotidos szekvencia preferenciát mutat, amely így mind a donor mind a célhelyen megtalálható.

A non-LTR retrotranszpozonokhoz hasonlóan az RC-transzpozonok nem csak inzerciós mutagén potenciállal rendelkeznek, transzdukáló képesek is [46]. A replikáció során a 3'ter felismerése nem elég hatékony, ezért a replikáció terminációja néha egy következő hasonló szekvenciánál következik be a gazdagénomban [47].



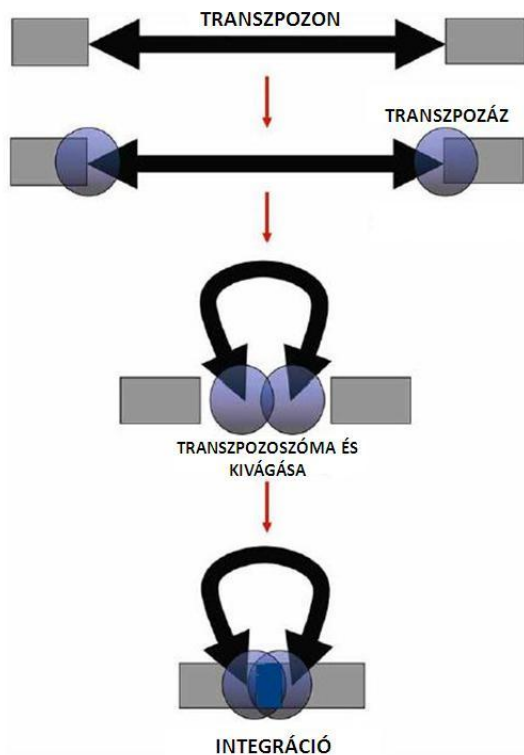
5. ábra. RC transzpozonok transzpozíciós mechanizmusa.

A transzpozon 5' végének *nick*-elésével a transzpozáz az 5'-foszfátot köti kovalensen, majd a 3'OH-végről replikáció indul. (**Bal panel**) Az egyik modell alapján a replikáció és az integráció elkülönülten zajlik egyszálas cirkuláris átmeneti formát képezve. (**Jobb panel**) A másik modell esetén a replikáció és az integráció kapcsolatosan történik. (Curcio, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003, ábrája alapján.)

2.3.3. DDE(D)-transzpozonok

A legjobban karakterizált transzpozon csoportba tartozik az elsőként felfedezett, és Barbara McClintock által leírt *Ac* elem is [48]. A klasszikus „cut and paste” transzpozázok dupla szálas DNS intermedier formájában kivágják a transzpozont a donor helyről, majd berakják egy tetszőleges célhelyre (IS, P, Tc, *mariner*, hAT). A katalitikus centrumot kialakító, és egymástól különböző távolságra elhelyezkedő Asp-Asp-Glu(Asp) aminosavak fontosságát számos mutagenézis vizsgálat bizonyítja [49]. A retrovirális integrázok krisztallográfiás vizsgálata igazolta, hogy a különböző aminosavszekvencia ellenére katalitikus domén struktúrájuk hasonló a DNS transzpozázokhoz, a DDE(D) motívum bennük is megtalálható, melynek elhelyezkedése is azonos [50]. A katalitikus centrumban struktúráisan kimutatható mind a két transzpozonvég, valamint két darab bivalens fém ion [51-53]. Ezt a struktúrát eredetileg az *Escherichia coli* RNáz-H fehérjéjénél írták le [54], majd emberben is karakterizálták [55]. Az enzim az RNS/DNS hibrid duplexben képez *nick*-eket, és elsődleges szerepe a DNS replikáció alatt a követő szál szintézisének befejezése az iniciációs RNS-ek bontásával. A DDE(D) transzpozázok innovációja, hogy az egy darab bivalens kation helyett kettőt tartalmaznak aktivátorként, így nem csak hidrolízist-, hanem transz-észterifikációt is katalizálnak. Az első kation aktiválja a cukor-foszfát hidrolíziséhez szükséges víz -OH csoportját, a második pedig az így keletkezett 3'-OH csoportot, mely a cél DNS-t a hidrolízishez hasonlóan támadja, és egyben keresztükötését eredményezi. A DDE(D) katalitikus domén – mely C-terminálisan helyezkedik el – feltehetően azonos eredetű az összes ilyen típusú fehérje esetén [56], így az egyes szuperfamiládokon belül jelentősen konzervált. Ezzel ellentétben a DNS kötő aktivitással rendelkező N-terminális domének, melyek a transzpozon felismeréséért felelősek, a legnagyobb diverzitást mutatják a családokon belül is. Az N- és a C-terminális domének között gyakran felismerhető a magi lokalizációs szignál szekvencia (NLS – *nuclear localization signal*) [57].

A transzpozíció két nagyobb fázisa a kivágás és az integráció, melyek feltehetően kapcsolatosak, bár erre nincs egyértelmű bizonyíték. Első lépés a cukor-foszfát lánc hidrolízise a donor helyen a transzpozon végeken. Ennek eredményeként közvetlenül vagy több lépésben 3'-OH végek keletkeznek a transzpozon DNS két oldalán. A transz-észterifikációt a célhellyel a katalitikus centrumba pozícionált 3'-OH végek indukálják. A mindkét DNS szál érintő teljes kivágódást megelőzően a dupla szálas transzpozon végek közel kerülnek egymáshoz a transzpozázok dimerizációján keresztül (transzpozozóma) (**6. ábra**) [51, 58]. Ennek elsősorban az a célja, hogy mindkét vég szimultán tudjon integrálódni a célhelyre, ahol az integráció pontszerűen megy végbe.



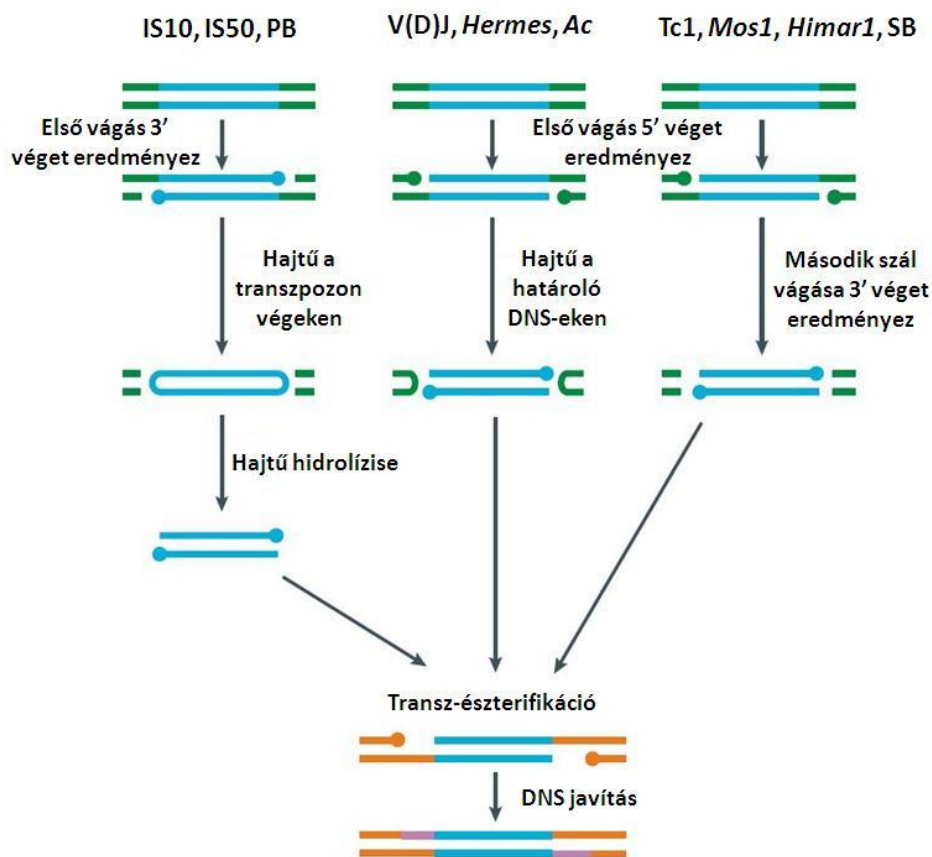
6. ábra. DDE(D) transzpozonok transzpozoszomális struktúrája.

A két végen elhelyezkedő ITR-eket köti egy-egy transzpozáz monomer. A kivágódás feltételeként a monomerek dimerizációjával létrejön a transzpozoszóma. (Munoz-Lopez, Current Genomics, 2010, ábrája alapján.)

A két 3'-OH transzpozon vég a komplementer DNS szálakat támadja a célhelyen, mely szterikus ok miatt nem azonos pozícióban történik, hanem 2-9 bázispár távolságra egymástól. Mivel az integráció mindkét oldalon csak az egyik DNS szál érinti, a másik szál folytonosságát a DNS javító rendszer állítja helyre. A komplementer cél DNS szálak eltolt hasításának köszönhetően bázispár hiányos hézagok (*gap*-ek) keletkeznek a transzpozon két oldalán, melyet szintén a sejt javító rendszere egészít ki (7. ábra **transz-észterifikációs lépés**). Mivel a *gap* szekvenciája mindkét oldalon azonos, a hiányos szál szintézisének eredményeként duplikáció keletkezik az eltolt hasítást fellelő szekvenciára nézve, mely a transzpozon integrációját követően mindkét oldalon fellelhető (TSD).

Több transzpozon vizsgálata is arra utal, hogy a transzpozoszóma létrejötte során az ITR-ek találkozása nem random-, hanem kooperatív folyamat, mely orientáció specifikus [59-63]. A DDE(D)-transzpozonok többféle stratégiát fejlesztettek ki a transzpozon végek mindkét szálának kivágására. A katalitikus centrum egyszerre csak egy vágást tesz lehetővé, mely eredményezhet 3'-OH vagy 5'-foszfát DNS szálvégeket a transzpozon végeken attól függően, hogy a transzpozáz melyik szálát vágta elsőnek. A keletkezett 3'-OH DNS végek nukleofil támadást gyakorolhatnak a komplementer DNS szálon. Ez önmagában megoldja a másik szál vágását, miközben hairpin struktúrák jönnek létre a transzpozon, vagy a határoló DNS végein, attól függően, hogy melyiken volt a 3'-OH vég (7. ábra, **bal- és középső panel**). A reakció teljesen azonos a 3'-OH végek célhelyre történő bekötésével. A transzpozon végen kialakuló hairpin esetén az integrációs lépést megelőzően elengedhetetlen a hairpin struktúra hidrolízise (7. ábra, **bal panel**) [64, 65]. A génbevitelben használatos PB (*piggyBac*) transzpozon is hasonló elven működik, melynek

mechanizmusára viszonylag nemrégiben derült fény [66]. Ennek részben oka az is, hogy a PB transzpozáz a retrovirális integrázokhoz hasonlóan szintén nem mutat szekvenciális homológiát a többi DDE(D) típusú transzpozázzal. A határoló DNS-en kialakuló hairpint a javító rendszer processzálja a kivágás helyének javítása közben, melyben a hurok hidrolízise gyakran nem centrális, és ezért szekvenciális nyomot (*footprint*) eredményez a kivágás helyén. A hAT család tagjai követik ezt a mechanizmust, például a rovarokban elterjedt *Hermes* vagy a növényekre jellemző *Ac* elem, illetve a V(D)J rekombináció során is hairpin struktúra figyelhető meg a kivágás helyén a szomszédos DNS végeken [67].

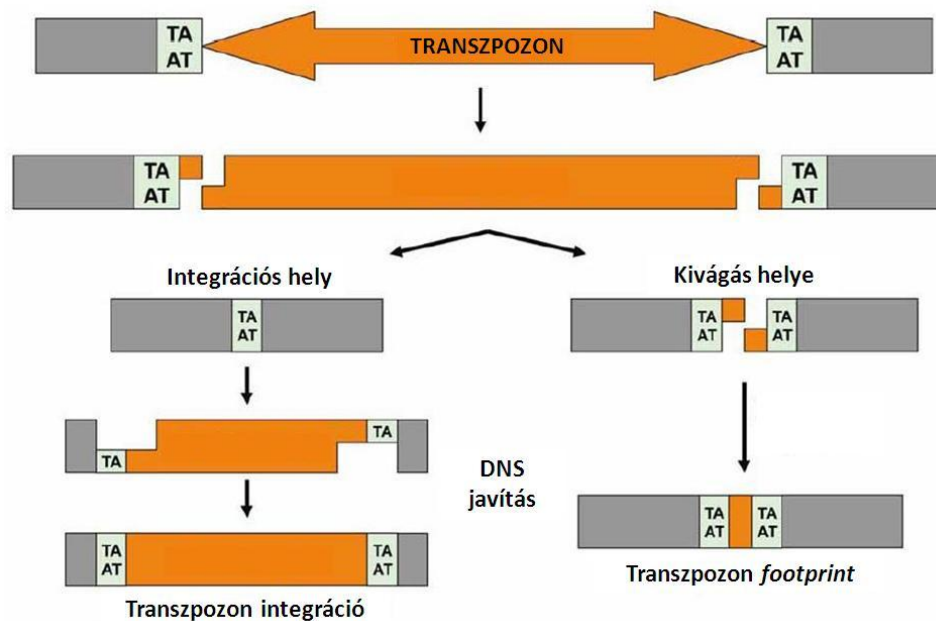


7. ábra. DDE(D) transzpozonok transzpozíciós mechanizmusai.

Az első *nick* eredményeként keletkező 3'-OH végek keresztköthetnek a komplementer DNS szállal, mely létrejöhet (**Bal panel**) a transzpozon végeken vagy (**Középső panel**) a szomszédos DNS végeken. (**Jobb panel**) A Tc1 és *mariner* elemek egymást követően vágják el a DNS szálat mindkét végen. (Curcio, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003, ábrája alapján.)

A klasszikus DDE(D) transzpozonok harmadik legnagyobb csoportját képezik azok a családok, melyek a két DNS szál vágását a végeken egymást követően valósítják meg, mindkettőt a transzpozáz aktív centrumának részvételével. A Tc1 és *mariner* transzpozázok TA dinukleotid célhelyet preferálnak és először mindig azt a szálat vágják, amelyik 5'-P véget eredményez a

transzpozon két végén. Ezt követi a másik szál vágása, mely kizárólag a transzpozozómában lehetséges, és amely már lehetővé teszi a 3'-OH vég nukleofil támadását a célhelyen (7. ábra, jobb panel) [68, 69]. A második vágás megfelelő pozicionálásához a transzpozozóma reorganizációja szükséges, ezért ez a sebesség limitáló mozzanata a kivágásnak [70]. A konformációs változáshoz a határoló TA dinukleotidok elengedhetetlenek. Az első vágás soha nem precíz, 3 bázissal beljebb történik a transzpozon ITR-ének végéhez képest. Ennek az lesz az eredménye, hogy a kivágást és javítást követően nem csak a TSD-, hanem a transzpozon néhány nukleotidja is *footprint*-ként visszamarad (8. ábra).



8. ábra. Tc1/mariner típusú transzpozonok kivágásának és integrációjának eredménye.

Az első szál vágása 5'-P véget eredményez a transzpozon végeken, és 3 bázissal beljebb történik a transzpozon ITR-ének végéhez képest. A második szál vágása pontos, a keletkező 3'-OH végek a célhelyen lévő TA dinukleotid két oldalán támadják a komplementer szálakat. (Munoz-Lopez, Current Genomics, 2010, ábrája alapján.)

A Tc1 és *mariner* elemek voltak az első olyan eukarióta DNS transzpozonok, melyekről bizonyították, hogy *in vitro* sejtmentes közegben is működőképesek. A *Caenorhabditis elegans*-ből izolált Tc1 elem és a bögölyből izolált *Himar1* esetén az interplazmikus transzpozíciós esszékben a tisztított transzpozáz fehérjén és donor-cél plazmidokon kívül Mg^{2+} ionokra volt szükség [71, 72]. Később a gyümölcslegyből izolált *Mos1*-ről is ugyanez derült ki [59]. Ez azt jelentette, hogy nem igényelnek sem ATP energia befektetést, sem speciális *host* (gazdában előforduló) faktorokat, ami nagy reményeket fűzött a heterológ sejtekben és az emlős

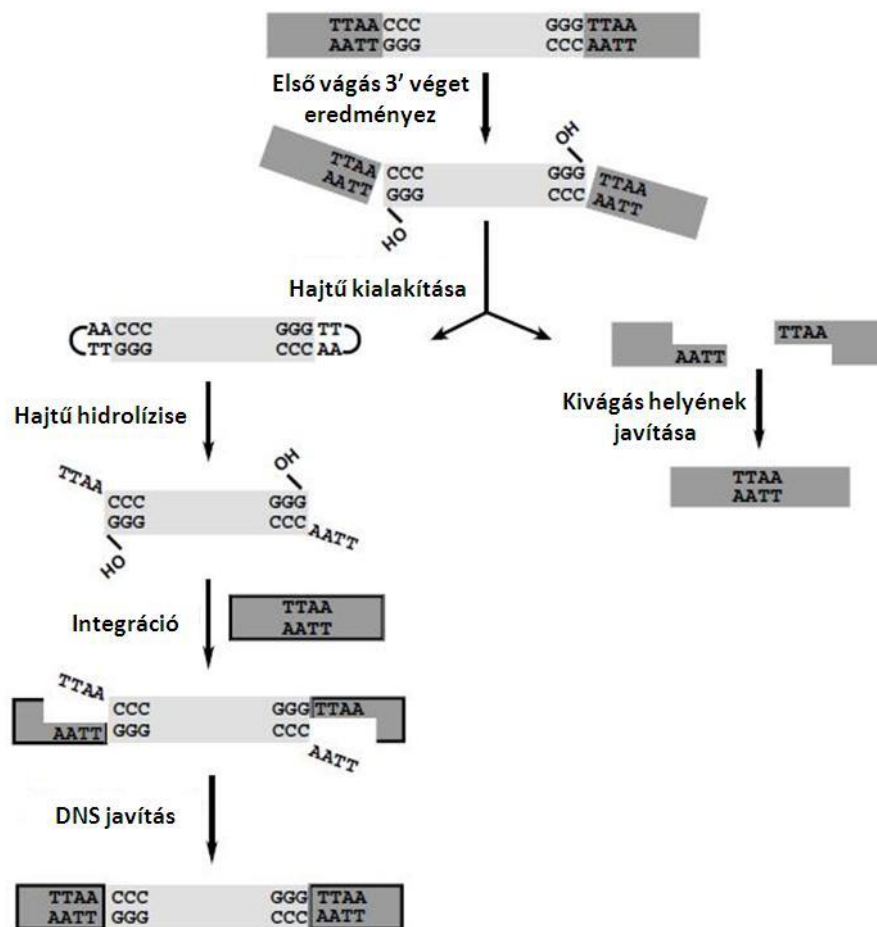
rendszerekben történő alkalmazáshoz. Az *in vitro* működőképesség reakciókinetikájuk részletes tanulmányozását régóta lehetővé teszi, ezért róluk rendelkezünk a legtöbb ismerettel [73].

A Tc1/*mariner* elemek között léteznek olyanok, melyek ITR-e két azonos orientációjú transzpozáz kötőhellyel rendelkezik (DR – *direct repeat*), ilyen például a Tc3 és az SB (*Sleeping Beauty*) [74, 75]. Esetükben tetramer alakul ki a szinaptikus komplexben, ám a katalitikus lépésekben feltehetően csak a külső transzpozáz kötőhelyhez kötött monomerek vesznek részt. A Tc3 esetén ugyanis a belső kötőhely hiánya nem hiúsítja meg a transzpozíciót, csak csökkenti a hatékonyságát [74]. Az SB esetén azonban ugyanezt nem sikerült igazolni [76], bár kizárólag sejtes esszén vizsgálták, ahol a kimutathatóságot csökkenti a véletlenszerű transzpozon integráció. Formálisan nem zárható ki, hogy a transzpozon végek összesen négy DNS szálának hidrolízisét különböző monomerek végzik, ahogy a Tn7 esetében. Ám a Tn7 első szálának vágását egy más típusú fehérje – restriktív endonukleáz – végzi [77]. A Tc1/*mariner*-ekre a dimeres transzpozíciós mechanizmus valószínűbbnek tűnik, melynek az SB- és a Tc3 esetén a tetramerizáció lehet a feltétele, vagy a hatékonyságot felerősítheti.

A PB mechanizmusa némileg eltér a kanonikus DDE(D) transzpozícióktól abból a szempontból, hogy nem veszi igénybe a sejt DNS szintézis rendszerét. Az integráció eredményeként nem maradnak *gap*-ek a célhelyen [66], ellentétben a hasonló mechanizmusú Tn5 és Tn10 transzpozonokkal [64, 65]. Ugyanazon okból a kivágás helyén sem marad *footprint*. Ez annak köszönhető, hogy a hairpin kialakítása a donor hely TSD-jének (TTAA) egyszálas szekvenciáját foglalja magába, így a kivágás helyén a TSD szekvenciájára komplementer 5' túlnyúló végeket hagy hátra (**9. ábra**). Tehát amellett, hogy a kivágás pontos, a TSD sem marad duplikáltan a genomban. Ezt követően a hairpin-ek feloldása pedig ugyanott történik, ahol a donor hely *nick*-elését követően a 3'-OH vég létrehozta. Emiatt a transzpozon végeken is 5' túlnyúló TSD-k jönnek létre, melyek a donor helyből származnak, és egyszerűen komplementarizálnak a célhely egyszálas TSD-jével kikerülve a *gap*-ek szintézisét (**9. ábra**).

Fontos megemlíteni, hogy a DDE(D) típusú DNS transzpozonok között léteznek replikatívak is, melyek legegyszerűbb képviselői kizárólag prokariótákban fordulnak elő (pl. Mu fág, IS2) [78, 79]. Esetükben nem vágódik ki a transzpozon, ehelyett a 3'-OH véget eredményező *nick*-eknek köszönhetően a másik szál vágása nélkül egyetlen szál integrálódik a célhelyre villa struktúrát kialakítva a donor-cél-transzpozon dsDNS komponensekből. A célhely szabad 3'-OH végéről replikáció indul, melyet az RC transzpozázokhoz hasonlóan a sejt apparátusa végez. Szintén ide sorolhatók a nemrégiben azonosított *Polintonok* (más néven *Mavericks*), melyeknek egyelőre nem ismerünk jelenleg aktív példányaikat [80, 81]. Az eukariótákban elterjedt, és a retrovirális integrázokkal rokon új fehérjecsalád felfedezése vezetett a *Polintonok* azonosításához,

melyek óriási méretű – akár 10 különböző proteint kódoló – DNS transzpozonok, és szintén nagyméretű ITR-el rendelkeznek (100-1000bp) [82]. Meglepően elterjedtek az összes eukariótában, és jellegzetességük, hogy saját DNS polimerázt (DNS polimeráz B) kódolnak, mely egyes bakteriofágokhoz-, illetve az adenovírusokhoz hasonlóan fehérjét használ a replikáció *primer*-eként. Így a *Polintonok* replikációja független a sejt DNS szintézisétől, melynek templátja egyszálas transzpozon DNS. Utóbbit a sejt gDNS replikációja alatt vághatják ki. Feltételezhető, hogy lineáris plazmidoktól származnak, melyek retrovirális integrázokra tettek szert, és nem kizárt, hogy az adenovírusok belőlük evolválódhattak [80]. A transzpozon dsDNS integrációja az LTR retrotranszpozonokhoz hasonlóan DDE(D) mechanizmusnak megfelelően zajlik.



9. ábra. *piggyBac* (PB) transzpozíciós mechanizmusa.

A PB mechanizmusa némileg eltér a kanonikus DDE(D) transzpozícióktól abból a szempontból, hogy nem veszi igénybe a sejt DNS szintézis rendszerét. Az integráció eredményeként nem maradnak *gap*-ek a célhelyen, és a kivágás helyén sem marad *footprint*. (Mitra, Embo Journal, 2008, ábrája alapján.)

A konjugatív DNS elemek kivágódásuk során a szomszédos DNS végeket rekombinálják egymással (**4A ábra**). Ezzel szemben a klasszikus „cut and paste” típusú DNS transzpozonok kivágódásuk után a szomszédos végeket a sejt DNS javító rendszereire bízzák. A DDE(D)

transzpozonok aktivitása tehát nem csak inzerciós mutagén potenciállal rendelkezik, dupla szálás töréseket (DSB – *double stranded break*) is generál a gDNS-ben, melyeknek javítása nem mindig állítja helyre az eredeti állapotot. A genomok jelentős része transzpozon eredetű, több-kevesebb homológiát mutató részekből áll, ezért a DSB homológia alapján történő javítása jelentős százalékban hibákra ad lehetőséget. Ezek eredményezhetnek duplikációt, deléciót, vagy transzlokációt [5, 83].

Némely „cut and paste” transzpozáz bizonyos százalékban abnormális transzpozíció kivitelezésére is képes, melyek minden esetben kromoszomális átrendeződést eredményeznek. Egyik fajtájuk, amikor a transzpozíció az ITR-ek orientációjára nem szelektív, azok elhelyezkedhetnek egymáshoz képest tandem, és fordított helyzetben is (IS10, Tn10, Ac) [84, 85]. Előfordul, hogy a transzpozícióban részt vevő transzpozon szekvenciák különböző lókuszon vannak (hibrid elem transzpozíciója, pl. Ac, P, PB) [86-88]. Végül pedig megfigyelhető a transzpozon szekvenciák szülő transzpozíciója [88].

A *mariner* elemek transzpozíciójának feltétele a szigorú DNS topológia, mely csökkenti a genetikai instabilitás lehetőségét a gazdaszervezetben [89]. Feltehetően ennek volt köszönhető sikeres terjedésük a gerincesek körében. Esetükben nincs *in vivo* bizonyíték az aberráns transzpozícióra, és az erre irányuló tesztek is alacsony százalékban eredményeztek szülő- vagy bimolekuláris transzpozíciót [88]. Az SB esetén megfigyelték, hogy szorosan együttműködik a nem homológ végek illesztéséért felelős NHEJ (*nonhomologous end joining*) javító rendszerrel [90]. Az SB interakciója a DNS kötő Ku70/Ku80 heterodimerrel odatoborozza az NHEJ rendszert, melynek elemei elősegítik, illetve limitálják a transzpozíciót. Bármely NHEJ faktor hiányában jelentősen csökken a transzpozíciók száma. Az SB transzpozáz így biztosítja azt, hogy a kivágás nagyrészt javításra kerül.

2.4. Transzpozonok „élettana”

A genomok transzpozon eredetű tartalma nagyon eltérő, és nincs összefüggésben a komplexitással, bár a régi elemek megtartása valószínűsíti, hogy a speciációs folyamatokban lehet szerepük. Például a főemlősökben és növényekben sok található, de élesztőben kevés [16, 91]. Az eukarióta genomok méretkülönbségeihez elsősorban a transzpozon eredetű elemek járulnak hozzá, amely különbség akár közeli fajok esetén is megfigyelhető [92, 93]. A retrotranszpozonok voltak a legsikeresebbek a genomok méretének növelésében. Növényekben az LTR retrotranszpozonok teszik ki a repetitív elemek nagy részét, például kukorica és rizs fajokban egymástól függetlenül duplázták meg a genomok méretét [94, 95]. Emlősökben pedig a non-LTR retrotranszpozonok

alkotják a genom jelentős részét (~35%), melyek aktív képviselői az *LI* retrotranszpozonok [16]. Ezzel szemben az endogén retrovírusok csak 8-10%-al járulnak hozzá az emlős genomhoz, és nincsenek aktív képviselői [96]. Ugyanakkor léteznek fajok, melyekben dominálnak a DNS transzpozonok. A *Trichomonas vaginalis* genomja 65%-ban DNS transzpozon eredetű, és főleg *Polintonok* népesítik be [81, 97]. *C. elegansban* szintén jelentősebb a DNS transzpozon tartalom [98]. Érdekesség, hogy egy másik protozoon, az *Entamoeba* különböző fajaiban jelentős kontraszt mutatkozik az RNS- és DNS transzpozon dominanciában, azonban a genom méretének hasonló részét alkotják [99, 100]. Bár az emlősök genomjához kis részben járulnak hozzá a DNS transzpozonok, meglepő diverzitást mutatnak. Az egyes családokat ITR-ük, illetve TSD-jük alapján különböztetik meg. Emberben 120 DNS transzpozon család fossziliái azonosíthatók, főemlősökben 40 családot találtak [16, 101]. A többi emlősben is magas a diverzitás, és úgy tűnik az egyes genomokban nem volt DNS transzpozon aktivitás 40-50 millió éve. Egyetlen kivétel a barna denevér (*Myotis lucifugus*), melyben a DNS transzpozonok jelentős részét viszonylag fiatal *Helitronok* alkotják [24], melyek konszenzusa működőképes [45]. Ezen kívül úgy tűnik, hogy a hAT, valamint a *piggyBac* család egyes tagjai jelenleg is aktívak némely populációjukban [102].

A retrotranszpozonok meglehetősen hatékonyan terjednek a genomon belül. Ennek oka egyrészt az, hogy az eredeti helyükön is megmaradnak (replikatívak). Másrészt cisz preferenciájuk összekapcsolja a translációt és a reverz transzkripciót. Ezzel szemben az eukarióta DNS transzpozonok esetén a transzpozáz funkciója transz módon hat, az enzimnek meg kell találnia a sejtmagban a neki megfelelő transzpozon szekvenciát, ami nem túl hatékony módja a terjedésnek. A retrotranszpozonok nagyobb sikeréhez az is hozzájárulhatott, hogy kevésbé invazívak a genom számára. Nem indukálnak DSB-ket, ami jobban veszélyezteti a genom stabilitását, mint az inzerció mutagenézis.

A „cut and paste” DNS transzpozonok az eredeti helyükön nem maradnak meg. Genomon belüli terjedésük kizárólag osztódó fázisú sejtekben lehetséges, amikor a kivágás javítása HR (*homologous recombination*) segítségével történik, és a testvérkromatida felhasználásával helyreállíthatja az eredeti transzpozont. Ez hatékony módja a kópiaszám növekedésnek például a P elem esetében, amely elsősorban osztódó sejtekben aktív [103]. Más transzpozonok a „frissen” replikálódott hemimetilált transzpozon DNS-t preferálják donorként [104], amely garantáltan két kópiában van jelen, így bármelyikükről történő kivágás helyreállításra kerül. Ezt a stratégiát követi például az *Ac* elem és egyes prokarióta DNS transzpozonok.

Az eukarióta transzpozonok életciklusa valamely gazdagenomban egyetlen autonóm alapító kópia bekerülésével kezdődik. A kópiaszám növekedése csak nagyon lassan-, bizonyos látencia eltelte után indul el tekintve, hogy a nyomokban jelen lévő transzpozáznak nehéz

megtalálni az 1-2 kópia transzpozont. Ezt a fázist a jelentősebb transzpozáz/transzpozon affinitás segíti a genetikai sodródással szemben. Majd egy bizonyos kópiaszám elérése után a növekedés exponenciális ütemet vesz fel, mivel minden egyes új kópia további aktivitásemelkedést eredményez. A növekedés tehát gyorsuló jellegű, és amennyiben semmilyen gátló tényező nem befolyásolná, fatális genetikai instabilitást okozna [105]. A túlélés miatt azonban jelentős szelekciós nyomás hat az aktív kópiák inaktiváló mutálódása felé. Az inaktiválódás egyik módja a katalitikusan inaktív mutáns transzpozáz megjelenése és terjedése a genomban (domináns negatív komplementáció). Az inaktív monomer gátolja a transzpozíciót, mert nem pusztán a transzpozon kötése miatt verseng az aktív monomerrel, hanem annak inhibitoraként csökkenti a működőképes dimerek létrejöttének esélyét [106]. A pontmutációval történő inaktiválódást a standard mutációs ráta okozza, ám a rá ható pozitív szelekcióra jellemző példa, hogy a genomokban megtalálható aktív Tc1/*mariner* elemek transzpozáz kódoló konszenzusa katalitikusan működésképtelen [107].

Az inaktiváló mutációk másik része internálisan deletált kópiákat eredményez, amely annak köszönhető, hogy a kivágás HR-el történő javítása gyakran abortálódhat, vagy nem megfelelő templátot használ, illetve többször vált templátot [108, 109]. A rövidebb transzpozonokat a transzpozáz általában hatékonyabban képes mozgatni kisebb méretük miatt. Az így kialakuló MITE-k (*miniature inverted-repeat transposable element*) olyan rövid (80-500bp) DNS transzpozon eredetű ismétlődő elemek, melyek ITR-ükről és TSD-jükről ismerhetők fel, nem kódolnak transzpozázt, és gyakran egyetlen vagy néhány alapító kópiára vezethetők vissza [110]. A MITE-k a DNS transzpozon eredetű szekvenciák túlnyomó többségét teszik ki a genomokban [105, 111]. A nem autonóm elemek azonban visszaszorítják az autonóm kópia terjedését. Ennek egyik oka, hogy kititrálják a transzpozázt a sejtmagból. Másrészt minél több a hiányos kópia, annál nagyobb az esély arra, hogy az autonóm kópia kivágását követően a donor helyet a javító rendszer hiányosan állítja helyre.

A hosszú élettartamú több sejtes életformák transzpozon toleranciája regulációs folyamatok jelenlétére utal. A genomiális amplifikáció a gazdaszervezet védekezési rendszerének adaptációját váltja ki az új „parazita” genetikai elemmel szemben. Ennek köszönhetően az RNS interferencia segítségével mind a MITE-k, mind az autonóm kópiák expressziója RNS degradációval, illetve kromatin szinten is csendesül a szervezet sejteiben [112, 113]. A szomatikus sejtek védelme különösen fontos az olyan szervezeteknél, melyek hajlamosak a rákra. A genetikai újraprogramozás azonban a csíravonalban nem tudja kikerülni a transzpozonok aktivációját, ezért a piRNS (Piwi fehérjével együttműködő kis RNS) rendszer elsősorban itt jut szerephez, amely rövid idő alatt, és többé-kevésbé tartósan csendesíti a transzpozon expressziót. Mindezek eredményeként kialakulhat az autonóm kópiák egyensúlyi kópiaszáma [105], mely

pozitívan korrelál a genom méretével és negatívan korrelál a populáció nagyságával. A nagyobb populáció hatékonyabban kiszelektálja a káros változásokat. Ám a túl kevés, és expressziósan csendesített autonóm kópia könnyen elmutálódhat, amely véglegesen megszünteti a transzpozon aktivitást a genomban (vertikális inaktiválódás teória) [2].

A DNS transzpozonok – a vírusokhoz hasonlóan – új gazdagenomba kerülésükkel biztosíthatják túlélésüket (horizontális transzfer), mely elég nehézkes, ha a gazdagenom elsősorban a csírvonalban engedi meg a jelentősebb aktivitást (vertikális transzfer). Viszonylag kevés meggyőző bizonyíték van a horizontális transzferre eukarióták esetén, amely valószínűsíthetően paraziták vagy vírusok genomjában „autóstopposként” valósul meg [2, 114]. Létezik azonban olyan transzpozon példa, a *Sleeping Beauty*, ahol a transzpozíció hatékonyabban működik nyugvó sejtekben, ezért a szomatikus sejtekben mutatott jelentősebb aktivitás elősegítheti a horizontális transzfert [115]. Az SB Miz-1 (*Myc-Interacting Zinc Finger Protein 1*) interakción keresztül visszatartja a sejtet a G1 fázisban, ahol magasabb a transzpozíciós aktivitás. Ennek az lehet az oka, hogy az NHEJ rendszer elősegíti a hatékony transzpozíciót [90], mely G1 fázisban jelentősebb.

A horizontális transzfer elsősorban olyan elemek esetén lehetséges, melyek nem igényelnek specifikus *host* faktorokat. Ez a Tc1/*mariner* elemek esetén *in vitro* bizonyított [59, 70-72], de a genetikai modifikációkban használatos más transzpozonok (pl. PB) számos heterológ rendszerben való működőképessége szintén erre utal [116, 117]. A horizontális transzferre leginkább a *marinerek*, valamint a P elem esetén vannak példák tengeri rákok, illetve rovarok távolabbi fajai között [118, 119]. Érdekesség, hogy az embert is megfertőző kampós féreg (*Ancylostoma caninum*) *mariner* szerű eleme az emberben megtalálható *Hsmar1* elemmel mutat legközelebbi rokonságot, mely szintén horizontális transzfert valószínűsít [120].

A szekvencia analízisek robbanásszerű fejlődése rámutatott, hogy a DNS transzpozonok összes szuperfamilája szinte minden eukarióta ágon megtalálható [121]. A vertikális inaktiválódás teória feltételezné az újabb inváziós betöréseket, ám a horizontális transzferre túl kevés a példa. A DNS transzpozonok ilyen mértékű elterjedtsége és diverzitása az eukariótákban aligha magyarázható pusztán horizontális transzferrel. Valószínűbbnek tűnik, hogy az egyes szuperfamilák a különböző ágakon közös eukarióta ősből működött transzpozonoktól származnak [98]. Erre utalhat, hogy az eukarióta szuperfamilák felének prokarióta IS elem is megfeleltethető. A vertikális inaktiválódást a DNS transzpozonok feltehetően diverzifikálódással kerültk el, melyre egyik példa az a 68 különböző *mariner*-szerű elem, amely 25 fűfajban található meg, és amelyek esetén nincs horizontális transzferre utaló jel [122]. Az autonóm elemek diverzifikációjához egyrészt új internális szekvenciák járulhatnak hozzá, melyeket a

kivágás javítása során szerezhethet a transzpozon [123, 124], és amellyel az autonóm elem elkerülheti a csendesítést. Másrészt a változás az ITR-eket, illetve azok kötési affinitását érintheti, amely mérsékeli a nem autonóm elemek mobilizálását [125, 126]. A MITE-k amplifikációja ilyen módon elsődleges mozgatója lehetett a DNS transzpozonok vertikális diverzifikációjának, mely hosszú távú evolúciójukat is lehetővé tette.

A természetben előforduló működő eukarióta transzpozonok számára elsősorban a csíravonalban, illetve az embrionális sejtekben megengedett a jelentősebb aktivitás. Mindez arra utal, hogy a megtermékenyülés és az embriogenezis stádiumai erőteljes szelekciós nyomást képviselnek, amely kizárólag kevésbé káros változásokat engedélyez a sikeres reprodukcióban [8, 9, 127, 128]. Ezért a jelentős transzpozon aktivitás elsődleges következménye a fertilitás csökkenése, amely gátat szab a túlzott mértékű károsító tevékenység vertikális terjedésének [14].

A genotoxikus hatás elkerülése a transzpozon túlélése szempontjából szintén kulcskérdés lehet. Az RNS interferencia nem nyújthat tökéletes védelmet, hisz az eukromatikus régiók transzpozon kópiái mentesülhetnek a totális csendesítés alól [129]. A naiv genomban mutatott kontroll nélküli aktivitásemelkedés pedig a piRNS rendszer adaptációját megelőzően is fatális lehet, ezért a transzpozonok részéről is evolválódtak invazivitást csökkentő tulajdonságok. A MITE-khez hasonló jelenség figyelhető meg az *LI* retrotranszpozon esetén, ahol maga a transzpozíciós mechanizmus többségében kisebb nem autonóm elemeket eredményez. Emellett az *LI* transzkripció elongációja fékezett sebességű (ld. 2.2.2 fejezet). Ennek köszönhetően csak 80-100 kópiát tartanak számon az emberben, ami valószínűsíthetően transzpozíció kompetens [16], és ezek expressziója a csíravonalban alig detektálható. Másik módja az invazivitás mérsékelésének a heterokromatikus régiók integrációs preferenciája, ahol minimális az inzerció mutagenézis káros hatása [130, 131].

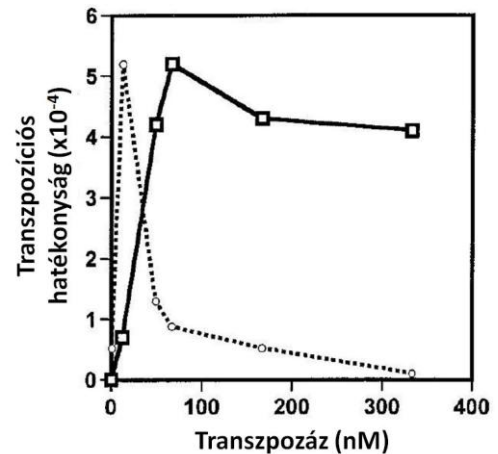
Végül talán a legismertebb mechanizmus a túltermeléses gátlás jelensége (OPI – *overproduction inhibition*), amely prokarióta transzpozonokra is jellemző, és amely *in vitro* is megfigyelhető [132]. Az OPI jelenségének lényege, hogy a transzpozáz koncentráció egy bizonyos határértéket meghaladóan gátolja a transzpozíciós eseményeket, így fékezi a genomiális terjedés sebességét. Eukariótákban első ízben egy *mariner* elemnél, a gyümölcslegyből izolált *Mos1* esetén mutatták ki *in vivo* [106]. A klasszikus transzpozonos alkalmazás során *Mos1*-et eredetileg nem tartalmazó gyümölcslegy törzseket használtak, melyeket *Mos1*-el módosítottak. Az *in vivo* megfigyelhető transzpozáz aktivitást indikátor donor transzpozon kivágódásával követték, amelyet az utódok fenotípusos statisztikája számszerűsített. Szignifikánsan kevesebb kivágódást figyeltek meg a *Mos1* transzpozázt dupla dózisban expresszáló szülők esetén.

A jelenség gyakran *in vitro* is megfigyelhető tisztított fehérjével végzett interplazmikus transzpozíciós kísérletben. Vizsgálták például a *Himar1*, valamint a *Mos1* esetén is (10. ábra.) [59, 61]. A *Himar1* esetén jelentős gátlás figyelhető meg, ellentétben a *Mos1*-el, ahol kevésbé tapasztalható kifejezett gátlás az *in vitro* kísérletben (10. ábra, pontozott vs. folytonos vonal), melynek kinetikája inkább telítésre hasonlít, és amely ellentétben áll az *in vivo* megfigyelt gátlással.

Szintén vizsgálták az emberből rekonstruált *mariner* elem, a *Hsmar1* [133] *in vitro* kinetikáját, amelynél sejtmentes környezetben is markánsan jelentkezik az OPI. A megfigyelt optimális transzpozáz koncentráció független volt attól, hogy a donor plazmidból történő kivágódást, vagy az interplazmikus integrációs eseményeket mérték [70, 105].

2.6. Transzpozonok jelentősebb alkalmazásai

A transzpozonok kezdeti alkalmazásainak elsődleges célja a génfunkciók kutatása volt (*forward* genetika). A transzpozon integrációkkal különféle mutációt idéztek elő véletlenszerű génekben, és a vad típustól eltérő fenotípusos változások kiemelésével az integrációs hely meghatározása azonosította a fenotípusért felelős mutáns gént. Kezdetben azokat a transzpozonokat alkalmazták erre a célra, melyek természetesen is előfordultak az adott laborállatban, például *C. elegans*-ban a Tc1-et és a Tc3-at [134, 135]. Az ilyen alkalmazásban a már meglévő kópiák, valamint az endogén transzpozáz aktivitás nehezítette a fenotípus izolálását és a mutáns gén azonosítását, amely csak többszöri keresztezésekkel volt megoldható, és nem garantálta a mutáns stabilitását [136, 137]. Egy adott transzpozon donor helyről történő



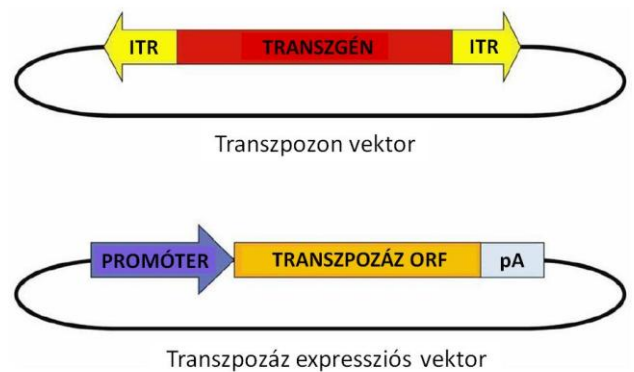
10. ábra. Transzpozíciós hatékonyság transzpozáz dóziszfüggésének *in vitro* vizsgálata.

Transzpozon integrációk donor plazmidra normalizált hatékonyságai a transzpozáz dózisének növelésével. (A transzpozon dózisa konstans.) Az *in vitro* reakcióelegyet baktériumba transzformálva a kettős rezisztens telepek számával mérték a donort tartalmazó akceptor plazmidokat. A pontozott vonal a *Himar1* dóziszfüggése, a folytonos vonal a *Mos1*-é. A görbék maximumait egymáshoz illesztették. (Tosi, Nucleic Acids Research, 2000, ábrája alapján.)

kivágódásának javítása gyakran eredményezi a környező szekvencia delécióját [138, 139], ezért a természetes transzpozon aktivitást több esetben gén targetálásra (*reverz* genetika) is tudták hasznosítani mind a *C. elegans*-ban [140], mind a gyümölcsleegyben [141]. A transzpozon kivágódásának hasznosításával specifikus génmódosítást tudtak előidézni, ha a kivágódás homológ rekombinációs javítását indukálták exogén templátot biztosítva a megfelelő génkonstrukció transzformálásával, ami tízszeresére növelte a mutagenézis esélyét [142, 143].

A mutagenézisekben előnyösebbek a heterológ transzpozonos rendszerek, amelyek nem interferálnak az endogén elemekkel, és a transzpozon/transzpozáz funkció szeparálásával jól kontrollálható rendszereket képeznek. A vad típusú autonóm transzpozonból nem autonóm elemet készítettek, a transzpozáz kódoló részt kiemelték, és más DNS szekvenciával helyettesítették, valamint az 5'- és a 3'UTR-ből csak a mozgathoz szükséges elemeket tartották meg (ITR) (11. ábra). Az így előállított transzpozont, valamint a transzpozázt kifejező komponenst különböző törzsekben tartották fenn, melyek keresztezésével mutagenézis indukálható. A leszármazottakban megfelelő százalékban kivágódott az eredeti helyéről a transzpozon, és integrálódott a genomba. A folytonos transzpozáz expresszió remobilizációt is eredményezhet az utódokban, ezért a transzpozáz expressziót feltételesen működő promóterrel kontrollálják (pl. aktiválható, vagy csírvonalra specifikus módon).

Idővel a *C. elegans* esetében is heterológ transzpozont vezettek be, a gyümölcsleegyből izolált *Mos1*-et [144, 145]. Az így fejlesztett *Mos1* bináris rendszer mutációs rátája elérte a mutátor törzsek Tc1 aktivitását [146]. A gyümölcsleegy esetében leggyakrabban használt rendszer a P elem, amely meglehetősen magas aktivitással rendelkezik saját *host*-jában, de máshol nem



11. ábra. A kétkomponenses DNS transzpozon rendszer elemei.

A nem autonóm transzpozon mozgathatóságát transz módon biztosított transzpozáz expresszió végzi. A vektorok sejtekbe történő kotranszfekciójával az átmeneti transzpozáz expresszióknak köszönhetően a transzpozon integrálódik a sejtek genomjába. Ilyen módon nem csak transzpozon tartalmú sejtek-, hanem törzsek is létrehozhatók, ha a megtermékenyített petesejtet vagy embriónt koinjektálják. A transzpozáz expressziós kazettáját gyakran egy másik transzpozonos rendszer alkalmazásával viszik be egy másik törzset létrehozva. A két törzs keresztezésével mutagenézis indukálható a leszármazottakban. (Munoz-Lopez, Current Genomics, 2010, ábrája alapján.)

alkalmazható. Nem régóta lehet jelen a *Drosophila*-ban, mert nem a laboratóriumi törzsekben találták. Ezért a heterológ transzpozonokhoz hasonlóan a bináris rendszert – a nem autonóm P elem tartalmú „mutátor” és transzpozáz expresszálo „jump starter” törzsek keresztezését – tudták alkalmazni [147]. A kiindulási törzseket az egyes vektorok véletlenszerű beépülésével nyerték, vagy a kétkomponenses rendszert koinjektálták az embrióba (**11. ábra**). A bináris transzgenézis hatékonyságát tízszeresére növelték, ha a transzpozáz expressziós vektor helyett *in vitro* szintetizált mRNS-t injektáltak az embrióba [148]. A módszer más modellállatok esetén is elterjedt, mert azonnali expressziót eredményezett, és csökkentette a mozaikosság lehetőségét, emellett a plazmid véletlenszerű beépülését is elkerülte, ami remobilizációt eredményezhetne. Eleinte azonban *Drosophila*-ban a mutagenézisekre az egyszerűbb *hybrid dysgenesis* jelenségét alkalmazták, ahol P aktivitással rendelkező fajtából származó hímet kereszteztek vad típusú nősténnyel [149, 150]. Az így létrejött hibridekben magas volt a mutációs ráta, mert a hatékony védekezéshez az anyai petesejtben már jelen lévő transzpozon ellenes piRNS-ekre van szükség [151]. A hibridek fertilitása a magas aktivitásnak köszönhetően teljesen leromlott.

A vírusokhoz hasonlóan a P elem erős integrációs preferenciát mutat a génekbe, mely feltehetően kromatin asszociációs faktorokkal való kapcsolatnak köszönhető, ahogy a vírusok esetén ez néha igazolható [152]. Így a P elem nem csak a gének elrontására alkalmas, de kiváló lehetőséget jelentett a transzkripció egységek térképezésére a különféle „csapdázó” (*trapping*) transzpozon konstrukciókkal [153]. Ezek jellegzetessége, hogy kizárólag a génekbe történő integráció váltja ki a transzpozon által kódolt marker fehérje expresszióját, melyet vagy a közelben lévő promóter/enhanszer vált ki, vagy a *splicing*, vagy az adott gén polyA szekvenciája, vagy pedig ezek együttes teljesülése. Valamely endogén RNS túltermeltetése (*overexpression*) is elérhető, ha a transzpozonnal erős promótert visznek be. A P elem előnye, hogy az 5'UTR régiókat jobban preferálja. A *trap*-elő transzpozonos rendszer az adott gének aktiválódásának nyomon követésére is alkalmas, mely sejttípus- és időfüggő. A P elem integrációjában forrópontok figyelhetők meg [154], ezért részben a gének nagyobb lefedettsége miatt más elemek is használatosak a *Drosophila*-ban. Ilyen a PB, a szintén gyümölcslégyben talált *Mos1* és *Minos* [155], valamint a hAT elemek közül a *Hobo* és a *Hermes* – utóbbiakat elsősorban transzgenézisre használják [156]. A PB szintén preferálja a génekbe történő integrációt, bár ő nem részesíti előnyben az 5' szabályozó régiókat. Ennek köszönhetően a *Drosophila* kódoló részeinek elrontásában jobbnak bizonyult a P elemnél [157].

Gyümölcslégyben gyakori módszer a gének térképezésére, illetve az együttműködő lókuszok azonosítására a kromoszómáisan deletált törzsek alkalmazása. Ezeket a törzseket transzpozonos rendszerek segítségével hozzák létre [158]. Az egyik módszer a P elem aberráns

transzpozíciós hajlamát használja ki, a hibrid elem transzpozícióját [87]. Ennek során többféle kromoszomális átrendeződés keletkezhet, melyek közül az egymás közelében elhelyezkedő elemek közötti deléciókra szelektálnak. A másik módszer az FLP/*FRT* rendszert használja [158], ahol az *FRT* szekvenciákat P elem segítségével vitték be különböző lokuszokra, majd az egymás közelében elhelyezkedő *FRT* helyekkel rendelkező törzseket keresztezték, melyek egyike az FLP rekombinázt is tartalmazza. Az indukálható rekombinázt expresszió hatására az utódokban deléció, illetve duplikáció keletkezik az *FRT* helyek közötti szekvenciára. A reakció teljesen azonos a konjugatív elemek integrációs lépésével (**4A. ábra**), azzal a különbséggel, hogy a résztvevő elemek – kromoszómák – egyike sem cirkuláris. Így helyspecifikus és indukálható kromoszóma transzlokációk hozhatók létre. Ezzel a módszerrel egyetlen gén deléciókat is létre tudtak hozni a *Drosophila*-ban. Az FLP/*FRT* rendszer felhasználásával különböző rekombináns sejt klónok generálhatók ugyanazon egyedben belül, ha a rekombinázt – promóterének köszönhetően – szövetspecifikusan és/vagy indukálható módon aktiválják. Például egy mutációra heterozigóta törzsben a szomatikus transzlokációval homozigóta mutáns, illetve vad típusú sejt szaporulatok keletkeznek [159]. Így a mutációk hatása bizonyos sejtekre korlátozódik, illetve kikerüli az embriógenézist, ezért például a recesszív letális mutációk jól tanulmányozhatók.

A konjugatív elemek közé sorolható Cre/*lox* rendszert régebb óta alkalmazzák emlősökön, mint a klasszikus transzpozonokat. Elsősorban a *loxP* helyek közötti szekvencia eltávolítására használják, melyet a Cre rekombinázt átmeneti expresszállatásával váltanak ki. A *loxP* helyeket vagy az általuk határolt transzgént rendszerint homológ rekombinációval vitték be tenyésztett embrionális őssejtekbe, majd szelekciót követően a sejteket blasztocisztába injektálták. Az indukálható és/vagy szövetspecifikusan expresszálló rekombinázt törzset hasonlóképp nyerték. A keresztezés utódaiban kivágható valamely gén, vagy akár aktiválható, ha a kivágás a promóter és a kódoló rész közötti határoló szekvenciát érintette [160, 161]. Ezzel a módszerrel olyan génfunkciók is vizsgálhatók, melyek mutációja vagy aktiválása egyébként letális lenne. A korábban alapított különféle Cre expresszálló törzseket azután sokféleképpen alkalmazták. Például a csapdázó technikák és a Cre/*lox*-, valamint az FLP/*FRT* rendszerek kombinálásával kondicionált gén inaktiválást valósítottak meg [162]. A módosított embrionális őssejteket először *splice* csapdázással szűrték az intronikus integrációra, majd a kazetta károsító csapdázó részét eltávolították (FLP/*FRT*) és létrehozták a törzset, melyet azután keresztezték a Cre törzsszel. Az utódokban az eredetileg hatástalan második *splice* csapda inverziójával inaktiválódott a fehérje. Ha a konjugatív elemek felismerő szekvenciáit egymáshoz képest fordított helyzetben alkalmazzák, a kihurkoló szinapszis (**4A ábra**) helyett hajtú alakú szinapszis alakul ki, így a rekombináció végeredménye kivágás helyett inverzió lesz.

Magasabb rendű gerincesek esetén eleinte kizárólag kémiai mutagénnel [163], illetve retrovírusokkal végeztek random mutagenezist [164], melyeket embrióba injektáltak. A mutagének pontmutációkat indukálnak, így az általuk okozott változás kevésbé drasztikus, mint az inzerció mutagenezis esetén, emellett a mutáció azonosítása nehezebb. A virális mutagenezis meglehetősen hatékony, de kevésbé kontrollálható, valamint a víruspartikulumok előállítására drága és körülményes. A transzpozonok ígéretesebbek voltak, ám az egykor működő DNS transzpozonok kihaltak a gerincesek genomjából, a retrotranszpozonok működőképességére azonban számítani lehetett. A két legnagyobb aktivitást mutató humán *LI*-et izolálták és alkalmazták kezdetben erre a célra egérben [165, 166], majd az egér *LI* kodonoptimalizált változatát, az *ORFeus*-t [167]. A mesterséges *LI* retrotranszpozon az eredeti endogén *LI* 3'UTR-ében, a pA szignál előtt tartalmazza fordított helyzetben a marker gén- vagy a transzgén expressziós kazettáját, amely mesterséges intront is tartalmaz. A reverz transzkripció során ez a rész íródik át elsőként cDNS-sé, ezért a *splicing*-ot követő megfelelő *LI* működés esetén az intronmentes transzgén mindenképp integrálódik a genomba, az ORF1 integrációjának azonban már kicsi az esélye (ld. 2.2.2 fejezet). Ennek köszönhetően az új integrációk többségében nem lesznek autonómok. Az intron biztosítja azt, hogy kizárólag a retrotranszpozíció eredményeként létrejött genomiális *de novo* integrációk eredményeznek markerexpressziót, melyek PCR-rel (*polymerase chain reaction*) is szűrhetők az intron hiányára.

A mesterséges transzpozont a plazmid petesejtbe történő injektálásával és véletlenszerű beépülésével juttatják be, így hozzák létre a mutátor törzset, melyet vad típussal kereszteznek. A natív *LI* alkalmazásával az új integrációk gyakorisága meglehetősen alacsonynak bizonyult [168, 169]. (Utódok 1-2%-a.) Az egér *LI* magasabb transzkripció sebességű kodonoptimalizált változatának, az *ORFeus*-nak a bevezetése – melyet már erős heterológ promotérral is elláttak – 30%-ra emelte az integrációk számát az utódokban [170]. Az injektált *ORFeus* tranziens expressziója elegendő volt csírvonalas *de novo* integrációk létrehozására az alapítókból. A magas aktivitásnak köszönhető mozaikosság miatt ismételt vad típusú keresztezésekkel izolálták a csírvonalas integrációkat, melyek 28%-a ismert géneket érintett, és az ismert géneknek 28%-át lefedte [170]. A magas hatékonyságú tranziens működés esetlegesen génbevitelre is alkalmassá tehetné az *ORFeus*-t tekintve, hogy az integrációk döntő többsége nem autonóm, melynek esélye tovább növekszik a transzgén méretével. A mozaikosság azonban eleve elkerülhetetlen, mert az *LI* embriogenezisben mutatott aktivitása magasabb, mint az azt megelőző csírvonalaképzés során [171]. Nagyobb probléma, hogy az *LI* integrációk átlagos hossza 1 kb, ezért a transzgén mérete meglehetősen limitált, emellett az integrációk hossza változatos, és nagy része a transzgénre is részleges. További hátrány, hogy az endogén *LI*-hez hasonló szintetikus kazetta csendesülése

várható hosszabb távon, melyet sejttenyészetben igazoltak [172]. A natív *LI*-el kombinált indikátor rendszer azonban kiválóan alkalmas az endogén *LI* aktiválódásának nyomon követésére az embrionális fejlődés során [173].

A DNS transzpozonok gerinces alkalmazására az SB megjelenéséig várni kellett, melyet hal genomból állítottak helyre, és humán sejtekben is aktívnak bizonyult [75]. A gerincesekben addig legjobban karakterizált Tc1-szerű elemek közül tíz különböző halfaj elemeinek filogenetikai analízisével kiválasztották a legfiatalabb alcsaládot. A funkcionálisan fontos szekvenciákat legjobban megtartott transzpozáz néhány példányából indultak ki, melyekből először eltávolították a „fatális” mutációkat (*frameshift*, idő előtti *stop*), majd a konszenzus segítségével egyenként helyreállították a funkcionális egységeket az aminosavak cseréjével. A konszenzushoz legközelebb álló szubsztrát ITR-t izolálták, amelynek transzpozáz kötő DR szekvenciája eleve intakt volt, és szerencsésen működőképesnek bizonyult a legelső *Sleeping Beauty* variánssal az SB10-el. Azóta az SB rendszer mindkét komponensét továbbfejlesztették. Ezzel párhuzamosan megtalálták a másik jelentős azonban természetes módon aktív transzpozont, melyről később kiderült, hogy működőképes és hatékony a heterológ rendszerekben, emlősökben is. A *piggyBac*-re egy olyan bakulovírus törzs genomjában találtak rá teljesen véletlenszerűen, amely az „autóstopposként” bekerülő transzpozonnak köszönhetően eltérő virális fenotípust mutatott. A mutáns vírustörzset az aranybagoly lepkéből (*Trichoplusia ni*) származó TN-386 sejtvonalból izolálták, melyben szintén megtalálták a transzpozont [174, 175].

Később más DNS transzpozonokról is kiderült, hogy működőképesek a gerinces modellorganizmusokban. Például a *Minos* alkalmazható emlős rendszerekben [62, 176], és a Medaka halból izolált *Tol2* is működőképes többek között humán sejteken [177, 178]. A *Tol2*-t zebrahalsban alkalmazzák elterjedten [179], emellett egér csírvonalas mutagenézisre is használták már [180]. Azóta más helyreállított DNS transzpozonok is megjelentek és használatosak gerincesekben és emlős rendszerekben, például a hüllőből helyreállított *Frog Prince* [181], vagy az emberből helyreállított *Hsmar1* [133]. A bináris rendszer szintén sikeresnek bizonyult a gerincesekben mind a génbevitelre, mind a mutagenézisre [153]. Emlősökben a legelterjedtebben alkalmazott transzpozonok az SB és a PB [22, 62, 182-194]. A gerinces inzerciós mutagenézis alkalmazásainál szintén bevetettek géncsapidázó transzpozonokat. Ezek előnye, hogy szűrni lehet a valódi mutagenézisre a marker expressziójával, illetve a *splice* helyek alkalmazása jó eséllyel „elrontja” az endogén fehérje funkcióját. Emellett az integráció azonosítása könnyebb a cDNS-ből mint a genomból. Emlősben a transzpozáz expressziós kazettában a hím csírvonalra szövetspecifikus protamin 1 promótert alkalmazzák. Ebben az esetben a két törzs keresztezéséből származó hím utódok spermiumában várható transzpozon

aktivitás, ezért új csírvonalas inzerciók csak a következő generációban lesznek. Konstitutívan működő virális enhanszerek bevetése esetén az inzerciót elszenvedő gén túltermeltetése a gyümölcslelgyhez hasonlóan egérben is elérhető. A transzpozonban lévő erős promóter és a transzpozáz szomatikus aktivitásának köszönhetően az SB bináris alkalmazásával tumorok indukálhatók, mely a potenciális onkogének azonosítására és kutatására ad lehetőséget [195, 196]. Egy másik alkalmazás a Cre rekombinázt szövetspecifikusan kifejező törzseket az SB expressziójának aktiválására használja a promóter és az SB kódoló rész közötti szekvencia eltávolításával, így a bináris rendszerrel kombinálva szövetspecifikus mutagenézissel váltottak ki tumorokat [197].

A klasszikus DNS transzpozonokra többé-kevésbé általánosan jellemző tulajdonság a *local hopping*, melynek köszönhetően az új integrációk a donor hely meghatározott kromoszomális környezetben várhatók. Ennek mértéke eltérő: a P elem 50-szeres preferenciát mutat 100 kb környezetben [198], míg az SB preferenciája jóval nagyobb régiót ölel fel (5-15 megabázis) [182]. Az *Ac* elem azonban eltérő preferenciát mutat különböző fajokban, amely a kromoszomális lokalizációval is változhat [153]. Az inzerciók mutagenéziseknél számolni kell azzal, hogy a mutációkkal csak egy adott régió szaturálható a transzpozon donor környezetében, a teljes genom lefedéséhez különböző donor lokuszokról kell indítani mutagenézist [199]. A *local hopping* miatt a balanszer törzsek ideálisan alkalmazhatók a mutagenézisben arra, hogy a segítségükkel bármilyen mutáció fenntartható heterozigóta formában tesztelés nélkül. A két komponenst hordozó törzsek keresztezésének hímnél utódait olyan törzsszel keresztezik, amely a donor régióra fordított balanszer kromoszómát tartalmaz, majd a balanszer jelenlétére előszűrnék [200].

2.8. Génterápia

A kromoszomális génbevitel sejtenyészeten való alkalmazása a génfunkciók *in vitro* sejt szintű tanulmányozását teszi lehetővé, mely vírussal és transzpozonnal egyaránt kivitelezhető. Az expressziós vektor DNS sejtbe történő bejuttatása (transzfecció) már önmagában fehérje termelést eredményez, mely funkcionálisan tanulmányozható. Az episzómális expresszió azonban rövid távú (tranzienst), mert az azt biztosító plazmid az osztódásokkal kihígul a sejtek citoplazmájában, de a nem osztódó sejtekben is idővel lebomlik. Így hosszú távú stabil expresszió egyedül a sejtek genomjából biztosítható. A DNS véletlenszerű genomális integrációja nagyon ritka, ám hatékony transzfecciót követő szelekcióval izolálhatók ezek a transzgenikus sejtek. Az integrálódó szekvencia kiterjedése azonban nem megjósolható tekintve, hogy a DNS véletlenszerű töréseinek és a javító rendszer közreműködésének köszönhető. A véletlenszerű beépülések akár

konkatamer (egymás után kapcsolt) formát is ölthetnek, amely több lineáris dsDNS vég sejtbe kerülésének a következménye. A konkatamer integrációk rendszerint *repeat* (ismétlődés) indukált csendesülést váltanak ki [201].

A vírusok saját apparátussal rendelkeznek a sejtmembránon történő átjutásra, így traszdukáló képességük nagyon hatékony. A sejtek magas százalékába bejuttatják DNS-üket, és az integrálódó vírusok a genomba is beépítik. A transzpozonok kétkomponenses vektor rendszerének (11. ábra) előállítás és transzfekciója azonban egyszerűbb és olcsóbb, mint a virális rendszereké. A donor- (transzpozont és benne a transzgént tartalmazó), valamint a *helper* (transzpozánt expresszáló) vektorok kotranszfekcióját követően a transzgénben lévő markerexpresszió segítségével szelektálhatók a transzgenikus sejtek. Ilyen módon az integrációra és expresszivitásra heterogén sejtpopulációhoz juthatunk. A sejtek klónozását (egyetlen sejt izolálása és növesztése) követően a klónok akár egyenként is jellemezhetők vagy használhatók.

A sejtszintű génbevitel a kutatási célokon kívül génterápiás, azaz szomatikus génbeviteli céllal is ígéretesen alkalmazható, eddig elsősorban immundeficienciák vagy a szem betegségeinek kezelésére alkalmaztak génbevitelt [202, 203]. Génterápiával olyan betegségek kezelhetők ígéretesen, ahol a fenotípusos korrekció elég hatékony ahhoz, hogy a tüneteket visszaszorítsa. Ennek kétféle általános megközelítését ismerjük jelenleg: 1., *ex vivo* génterápia, ahol a targetált sejteket izolálják az egyénből, és ezeket módosítják, majd visszajuttatják; 2., *in vivo* génterápia, amikor a gént direkt módon bejuttatják az egyénbe, amely ott *in situ* módosítja a targetált sejteket. A génterápiás stratégiák két legfontosabb szempontja a beviteli hatékonyság és a biztonságosság. További szempontok, hogy a bevitt komponens ne legyen immunogén, valamint hosszú távú terápiás hatást biztosítson. A transzpozonok bevezetése előtt főleg genomba integrálódó lentivírusokat és adeno-asszociált vírusokat alkalmaztak [204, 205]. A virális integráció génpreferenciája, valamint a vírusszekvenciák és a transzgén promóter aktivitása onkogének expresszióját válthatja ki, ahogy arra már sajnos klinikai példák is figyelmeztetnek [206, 207]. Emellett a virális szekvenciák számos esetben immunreakciót indukálnak [208, 209].

A DNS transzpozonok előnyös alternatívát jelentettek elsősorban azért, mert kedvezőbb integrációs profillal jellemezhetők [210, 211]. Az SB ezen előnyének és a számos preklinikai vizsgálatnak köszönhetően klinikai kipróbálási fázisba léphetett speciális leukémiák és limfómák kezelésében [212]. CD19 felszíni membránfehérjét tartalmazó B limfoid sejtsejtszaporulatok célzott eliminációját oldották meg hatékonyan az SB11 alkalmazásával. T sejtek *ex vivo* genetikai módosításával CD19 ellenes kiméra antigén receptort termeltek, melynek köszönhetően a T sejtek felismerik és elpusztítják a tumoros sejteket. Szintén klinikai fázisba lépett az SB a leggyakoribb retinadegenerációk *in vivo* génterápiás gyógyításában [213]. A retina neurális

leépülését visszafordító faktort juttatnak a retina pigment epítél sejtekbe, melyek lokálisan könnyen hozzáférhetők az *in vivo* transzfekcióhoz.

A gerinceseken régóta használt SB és az eredetileg is hatékony PB aktivitását folyamatosan fejlesztették annak érdekében, hogy a virális génbevétel robosztus hatékonyságával fölvegyék a versenyt. Az emlősökre kodonoptimalizált mPB kétszer hatékonyabbnak bizonyult az eredeti transzpozázhoz képest egér embrionális őssejteken (ES) [214]. Az eredeti PB és az mPB aktívabbnak mutatkozott az akkor létező hiperaktív SB variánsoknál (SB11 és SB12) [215, 216]. Az SB100X kifejlesztése számos egyedi-, aktivitást növelő mutáció részben random-, részben szisztematikus kombinatorikus tesztelésével történt [192]. Ennek eredményeként a legaktívabb variáns kivágása 100-szoros, az integrációja 80-szoros emelkedést mutatott az eredeti helyreállított SB-hez képest. A kivágás hatékonyságát rendszerint egykópiás indikátor transzpozont tartalmazó klónon mérik, ahol a kivágás helyreállítja a marker expresszióját, így minden esemény egyedileg detektálható sejtenként. Pár évvel később PCR-es mutagenézissel kifejlesztettek egy hiperaktív PB-t (hyPB) [190], melynek kivágása 17-szeres-, integrációja pedig 9-szeres emelkedést mutatott egér ES sejtekben (*embryonic stem cell*) az mPB-hez képest. Az SB100X és az mPB, valamint a hyPB génbeviteli hatékonyságainak összehasonlítása eltérő eredményekre vezetett [191, 217-219]. Mindezt azzal magyaráznak, hogy az egyébként hasonló hatékonyságok mellett az SB érzékenyebb lehet az OPI-ra, ami a PB esetén nem mindig észlelhető [216]. Ellentétben az SB-vel, amely sejtes rendszerben tesztelve gyakran produkál a génbevételben gátlást a transzpozáz dózisének növelésével [217, 220-223]. A kétkomponenses rendszer kotranszfekcióját rendszerint alacsonyabb *helper* plazmid dózissal végzik, hogy elkerüljék a túltermeléses gátlás jelenségét, vagy többféle donor/*helper* arányt alkalmaznak. A transzpozonos rendszer alkalmazható *helper*-független egykomponenses formában is, ahol a transzpozon és a transzpozáz expressziós kazetta ugyanazon a plazmidon foglal helyet [224]. Ebben az esetben a transzpozáz expressziója különböző erősségű promóterekkel szabályozható, ám a donor/*helper* arány utólag nem korrigálható. Így az egykomponenses rendszer a génterápiában néha kedvezőtlenebb eredményt ad, mint a kétkomponenses rendszer [225].

A transzgenikus hatékonyságok mellett fontos szempont a mobilizálható transzpozon mérete (*cargo* kapacitás). Az SB 6,5 kb feletti transzpozont csak jelentős hatékonyságcsökkenéssel tud mozgatni [60, 76, 220]. Az ITR-ek (IRDR – *inverted repeat direct repeat*) szendvics struktúrában történő használata 10 kb feletti transzpozon esetén is hatékony transzpozíciót eredményez [221]. Ez a *cargo* kapacitás már jól használható génbevételre tekintve, hogy a humán cDNS-ek 80%-a kisebb, mint 7 kb [16]. A PB 14-18 kb méretig hatékony a génbevételben [62, 226], de mind az mPB mind a hyPB 100 kb méretet is tud mozgatni,

természetesen alacsonyabb hatékonysággal [227]. Így a PB transzpozon több cDNS egyidejű bevitelére vagy teljes gének processzálására alkalmas, a szabályozó részeket is beleértve. Ezért a PB ideálisnak bizonyult az indukált pluripotens sejtek (iPS) létrehozására, ahol négy különböző visszaprogramozó transzkripciós faktor bevitelére van szükség (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) [228, 229]. Az iPS technológia ígéretes az allogén transzplantációra. A betegből származó sejtek visszaprogramozhatók összejtnek megfelelő differenciációs potenciálú állapotba, majd módosítást követően megfelelő szöveti irányba differenciáltathatók és beültethetők. A visszaprogramozó faktorok azonban gátolják a későbbi differenciációt, és onkogén potenciállal rendelkeznek [230-232], ezért eltávolításuk a génterápiás alkalmazás feltétele. A visszaprogramozás tranziens expresszióval is kivitelezhető [233-235], bár ezek hatékonysága meglehetősen variál, és esetenként nagyon alacsony. A PB hatékonysága az iPS előállításában a retrovírusokéval összemérhető, emellett a kazetta kivágását is megoldották a PB transzpozáz tranziens expressziójával [236, 237]. A transzgén eltávolítására azóta integráció-deficiens PB transzpozáz variánst fejlesztettek ki [238]. Utóbbi szempontból a PB azért is hasznos, mert nyom nélkül képes a transzpozon kivágására **(9. ábra)** [66].

Az *ex vivo* génterápia által targetálható sejtek közül a legjelentősebbek a hematopoetikus őssejtek (HSC – *hematopoietic stem cell*), mert könnyen izolálhatók és visszajuttathatók. A HSC-k felhasználásával hematológiai, illetve immunológiai rendellenességek kezelhetők [239-241]. Az SB100X által elérhető génbeviteli hatékonyság 35-50%, és ez jóval meghaladja az mPB által elérhető hatékonyságot ezen a sejtípuson [217, 218]. Az SB-vel módosított sejtek jól differenciáltathatók *in vitro* a különböző hematopoetikus irányokba, és beültethetők immundeficiens egerekbe *myeloablatve* (csontvelőt pusztító) kezelést követően [218, 242]. Szintén hatékonyan alkalmazták az SB100X-at mezenhimális őssejteken (MSC – *mesenchymal stem cells*), valamint mioblasztokon, mely a differenciációs potenciált nem befolyásolta [243]. Az MSC-k csont, porc és zsírszövet képzésére alkalmasak [244]. A mioblasztok pedig felhasználhatók izom rendellenességekben vagy kardiovaszkuláris betegségekben. Izom irányú transzkripciós faktor iPS-be történő bevitelét is kipróbálták sikerrel az SB100X alkalmazásával [243].

Az *in vivo* génterápia kezdeti DNS beviteli módszere az egér farokvéna hidrodinamikusan (HD) injektálása [245]. Foszfát pufferben oldott tömény DNS használatával a májsejtek 10%-a felveszi a DNS-t, mely a máj endotél folyadéknyomással történő roncsolódásának és a májsejtek endocitózis-készségének köszönhető. A máj ideális targete az örökletes metabolikus betegségek génterápiájának, mivel nagy részük innen ered. A HD injektálás azonban nagyobb testű modellállatok esetén már nehezen kivitelezhető, ezért a sejttenyészeteken alkalmazott

transzfekeciós reagenseket fejlesztették tovább. Vénásan alkalmazott polietilénimin-, vagy nanopartikulum alapú transzfekecióval tüdő-, illetve máj endotélsejteket tettek transzgenikussá az SB felhasználásával [246, 247]. Az endotél keringés közvetítésével végzett *in vivo* transzfekeciója elsősorban olyan betegségek esetén lehet sikeres, ahol alacsony expresszió elérésével is csökkenthetők a tünetek, és a vérbe jutó transzgen termék megfelelő hatást vált ki. Ilyenek a különböző hemofiliák, ahol az egészséges koagulációs faktor szint 1%-a is elegendő a vérzékenység csökkentéséhez [23].

A megfelelő hatékonyságú transzfekeció elérése érdekében az *in vivo* génterápiában jelentős alternatívát jelentenek a vírusok. Egyik előnyük, hogy a virionfelszín segítségével esetlegesen targetálhatók bizonyos sejtípusokra, azonban a kromoszomális integrációra kevésbé kedvezőek. Ígéretes módszer az integráció defektív hibrid vírusok alkalmazása, ahol a kétkomponens transzpozon rendszert víruspartikulum segítségével juttatják be a sejtbe, a transzgen integrációját pedig az SB transzpozáz végzi. Az első nagyobb testű állaton végrehajtott *in vivo* génterápiás preklinikai alkalmazást adenovírusba csomagolt SB rendszer biztosította jó hatékonysággal [248]. A donor/*helper* arány optimalizálhatósága miatt általában külön víruspartikulumban juttatják be a két komponenst.

Számos ritka genetikai betegség esetén végeznek preklinikai vizsgálatokat az SB-vel állatmodelleken, illetve szövettenyészeteken. Az eddig említetteken kívül a teljesség igénye nélkül például enzimhiány okozta mukopoliszaharidózisokban, izom disztrófiákban, kötőszöveti rendellenességekben, tirozinémiában, valamint Huntington kórban [249]. Utóbbi esetben siRNS-t (*small interfering RNA*) alkalmaznak, mely a cél RNS degradációját váltja ki. A ritka genetikai betegségek génterápiájában nagy reményeket fűznek a *trans-splicing* technikához [250], amely pre-mRNS szinten korrigálja a hibás gént, és melynek génterápiás működését állatmodellen az SB felhasználásával igazolták [251]. A technika fő előnye, hogy a káros géntermék szintet a korrekcióhoz kapcsolatosan csökkenti a transzgenikus sejtekben.

Bár az SB integrációs profilja közel random, a génekbe történő integráció esélye mégsem elhanyagolható. Mind az SB mind a PB esetén erőfeszítéseket tettek annak érdekében, hogy a transzpozáz által katalizált integrációt irányítsák meghatározott biztonságos genomi szekvenciákra. A heterológ DNS-kötő domének fúziója a transzpozáz proteinhez az SB esetén lerontja a transzpozíció hatékonyságát [252], a PB transzpozáz azonban jól tolerálja az N terminális fúziót [253]. Az ilyen transzpozáz variánsok targetálásának hatékonysága és specifitása további fejlesztéseket igényel.

3. CÉLKITŰZÉSEK

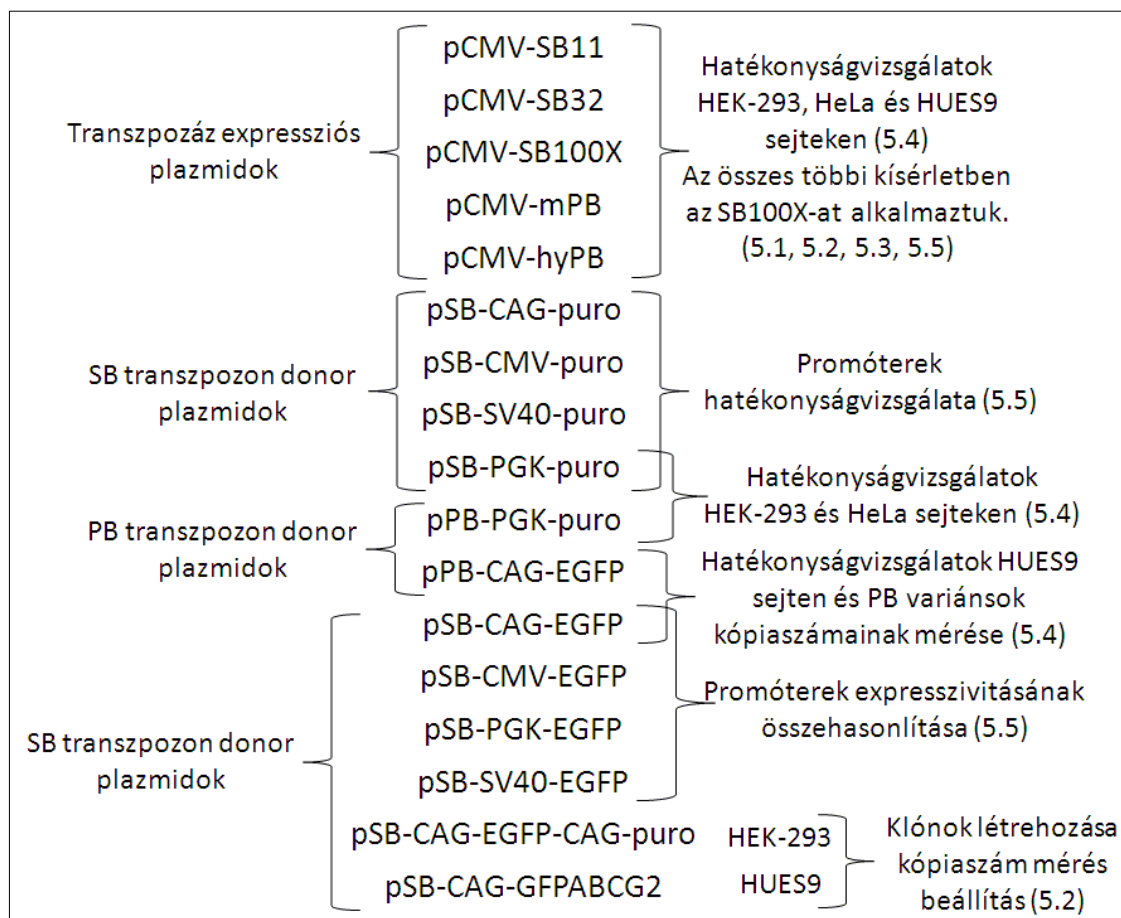
A transzpozonok génterápiás célú felhasználásának előfeltétele a különböző sejteken történő karakterizálás, különösen a progenitor sejteken vagy őssejteken végzett genetikai manipulációk biztonsága miatt, melyek fokozott malignus potenciállal rendelkezhetnek. Munkám kezdetéig kevés olyan tanulmány született, amelyik szisztematikusan karakterizálta és összehasonlította az egyes génbeviteli rendszereket. Ezek sejtípustól függő különbségekre mutatnak rá, többségük azonban csak egy-egy – gyakran tumoros – sejtípus vizsgálatára korlátozódott. A különböző tanulmányok az egyes applikációk eltérései miatt sokszor nem összehasonlíthatók. Emellett a génbevétel hatékonyságát a DNS transzpozonokra jellemző, a transzpozáz dóziséntől függő túltermeléses gátlás jelensége jelentősen csökkentheti. A gátlás jelenségének a génbevételben mutatott jelentőségére vonatkozóan pedig ellentmondásos adatokat találhatunk az egyes tanulmányokban. Munkám során elsődleges feladatomban a DNS transzpozonnal történő génbevétel sejt szintű vizsgálata és optimalizálása volt. A következő célokat tűztük ki:

1. Transzgén expressziójának és csendesülésének vizsgálata SB transzpozonos rendszerrel transzfektált sejt populáción.
2. Transzpozonos rendszer génbevételben mutatott aktivitásának mérésére alkalmas módszerek beállítása (kivágás, kópiaszám).
3. SB integrációs helyek meghatározása és karakterizálása.
4. Túltermeléses gátlás jelenségének vizsgálata és a génbevétel optimalizálása különböző sejteken a két leghatékonyabb rendszert illetően (SB és PB DNS transzpozonos rendszerek).
5. Transzgénben alkalmazható néhány promóter összehasonlítása a génbevételben.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Plazmid konstrukciók

A transzpozáz fehérjét standard expressziós plazmidokról fejeztettük ki a sejtekben, melyeket CMV promóter szabályozott minden esetben. A következő transzpozáz fehérjét alkalmaztuk: SB11, SB32 és SB100X variánsok [192]; mPB [214], és hyPB variánsok [190]. Az SB IRDR-ek T2 változatát alkalmaztuk [220], az SB transzpozon plazmidokat egyetlen kiindulási vektorból állítottuk elő, a transzgén módosításokat kazettacserés vagy PCR-es klónozási technikával végeztük [254]. A PB transzpozon szekvenciákat PCR-el amplifikáltuk egy megfelelő templát PB transzpozon plazmidról (PB-SB-PGK-Neo-bpA) [189], majd beépítettük az SB-PGK-puro, valamint az SB-CAG-EGFP konstrukciókba az SB transzpozon szekvenciáinak cseréjével [254]. A kópiaszám mérés beállításához használt HEK-293 klónokat az SB-CAG-EGFP-CAG-puro transzpozon bevitelével, a HUES9 klónokat az SB-CAG-GFPABCG2 transzpozon bevitelével állítottuk elő [255]. Az egyes projektekben alkalmazott plazmidokat az alábbiakban foglaltuk össze (**1. táblázat**).



1. táblázat. A kutatások során felhasznált plazmidok.

4.2. Sejttenyésztések és sejtklónok létrehozása

A kísérletekhez használt HEK-293 és HeLa sejtvonalakat 10% hőinaktivált FBS szérummal (*fetal bovine serum*), 1% L-glutaminnal és 1% penicillin/streptomycin antibiotikummal kiegészített DMEM tápoldatban (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok), 37°C-on 5% CO₂ inkubátorban tartottuk fenn. A klónok létrehozásához a kétkomponenses transzfekciót követően a HEK-293 sejteket áramlási citométer (FACS) segítségével dúsítottuk (ld. alább), majd sejt számtól függően hígítottuk és 96 lyukú lemezre szétosztottuk. Az egyetlen klónokat tartalmazó lyukakat mikroszóp segítségével azonosítottuk és tovább szaporítottuk, FACS-on mértük az expresszió intenzitását (ld. alább), majd később genomi DNS-t tisztítottunk belőlük (ld. alább). A humán embrionális őssejt vonal (HUES9) Dr. Douglas Melton laboratóriumából származik (Harvard Egyetem, Egyesült Államok), fenntartása mitomycin-C-vel kezelt egér embrionális *feeder* sejteken HUES médiumban (15% ko szérum *replacement*, 80% KoDMEM, 1 mM l-glutamin, 0.1 mM beta-mercaptoethanol, 1% nem esszenciális aminosav, 4 ng/mL humán fibroblaszt növekedési faktor) történt [256]. A HUES9 sejteket a 35. passzáztól tenyésztettük és alkalmaztuk. Az embrionális őssejt klónok létrehozása korábban leírt módszer alapján történt [257].

4.3. Transzfekciók és transzpozíciós esszék

Minden transzfekciót duplikátumban végeztünk. HEK-293 sejtől 2×10^5 , HeLa sejtől 4×10^5 sejtszámot raktunk ki 12 lyukú lemezre, melyeket másnap FuGENE 6, illetve FuGENE HD reagensekkel transzfektáltunk a gyártó utasításainak megfelelően (Roche, Bazel, Svájc). A maximálisan alkalmazható DNS mennyiség 50-75%-át transzfektáltuk, melyben a hatékonyságvizsgálatok kivételével 10:1 arányban alkalmaztuk az SB transzpozont és az SB100X transzpozózt. A hatékonyságvizsgálatokban magas transzpozon dózis (10:0,1-20) esetén 250 ng, alacsony transzpozon dózisonál (1:1-20) 25 ng transzpozon plazmiddal transzfektáltunk változó mennyiségű transzpozáz plazmid mellett. Minden puromycin-es transzgen transzfekcióban 250 ng pCMV-EGFP kontrollal kotranszfektáltunk a transzfekció hatékonyságának mérésére. Az összehasonlító vizsgálatokban pET-41 (Novagen) plazmiddal azonos mennyiségre egészítettük ki a transzfektált DNS-t. A kontroll transzfekciókban transzpozáz expressziós plazmid helyett pET-41 plazmidot tettünk a transzfekciós keverékbe. Transzfekciót követő 48. órában a sejtek tizedét FACS-on mértük a transzfekciós hatékonyság megállapítására. A sejtek 1%-át ekkor kiraktuk kolóniaesszére sejttenyésztő petri csészébe 1 $\mu\text{g/mL}$ puromycin (Sigma-Aldrich, Saint Louis,

Missouri, Egyesült Államok) tartalmú DMEM-be, melyet két hét elteltével metanollal fixáltunk és Crystal Violet festékkal festettünk a gyártó utasításainak megfelelően (Sigma-Aldrich). A kolóniákat 75S modellű gél-dokumentációs rendszerrel fényképeztük, és Quantity One 4.4.0 szoftver segítségével megszámloltuk (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Egyesült Államok). A kolóniaesszére kirakott sejtszám és a transzfekciós hatékonyság ismeretében transzgenikus rátát számoltunk, a kolóniák (transzgenikus sejtek) számát a transzfektált sejtek százalékában adtuk meg.

Transzfekciót követő 48. órában a sejtek tizedét puromycin-es DMEM-be passzáltuk és három hétig antibiotikumban tartottuk fenn, majd genomi DNS-t tisztítottunk az átlagos kópiaszám meghatározására. A transzfektált sejtek maradékát 48. óránál a parallel transzfekciók összekeverését követően kvantitatív kivágási PCR analízisre tettük félre (ld. alább). A PB átlagos kópiaszám méréséhez CAG-GFP tartalmú transzpozonnal transzfektáltunk HEK-293 sejteket 10:1, 10:10, és 1:10 transzpozon / transzpozáz arányokkal a fent leírtaknak megfelelően, majd a 48. órában és azt követően két hét után FACS segítségével szortoltuk a sejteket, melyekből gDNS-t tisztítottunk.

A nukleofekciós kísérletekben HEK-293 sejtől 5×10^5 sejtszámot elektroporáltunk Nucleofector V kittel és Nucleofector II készülék segítségével a gyártó utasításainak megfelelően (Lonza Group, Bázél, Svájc). Egy mikrogramm SB-CAG-EGFP transzpozont transzfektáltunk változó mennyiségű SB100X transzpozázzal, a transzfekciókat pET-41 plazmiddal azonos DNS mennyiségre egészítettük ki. A kontroll transzfekcióban transzpozáz expressziós plazmid helyett pET-41 plazmidot tettünk a transzfekciós mixbe. Nukleofekciót követően 6 lyukú lemezre tettük a sejteket. Transzfekciót követő 48. órában a sejtek huszadából ellenőriztük a transzfekciós hatékonyságokat FACS segítségével, és a maradék sejtekből kvantitatív kivágási PCR analízist végeztünk.

HUES9 sejtől 2×10^6 sejtszámot (passzálásra érett 6 lyukú lemezről) nukleofektáltunk Human Stem Cell Nucleofector 1 kittel a gyártó utasításainak megfelelően (Lonza Group). Szintén 1 μ g CAG-EGFP transzpozonnal transzfektáltunk változó mennyiségű transzpozázzal a HEK-293 sejt nukleofekciójánál leírtakhoz hasonlóan. Transzfekciót követő 48. órában a sejtek tizedéből ellenőriztük a transzfekciós hatékonyságokat FACS segítségével, harmadukat tovább passzáltuk, a maradékukból kvantitatív kivágási PCR analízist végeztünk. A tovább fenntartott sejteket két későbbi időpontban (1 és 2 héttel később) ismét megmértük FACS-on. Az utóbbi GFP pozitív sejtarányokat elosztottuk a 48. órában mért transzfekciós hatékonysággal, így a transzgenikus rátával arányos mennyiséget kaptunk (GFP index). A HUES9 sejtben elérhető

átlagos kópiaszámok meghatározására 10:10 arányban nukleofektáltuk az SB-, illetve a PB-CAG-EGFP transzpozonokat a fent leírtaknak megfelelően. A 48. órában, valamint két hét elteltével szortoltuk a sejteket, később gDNS-t tisztítottunk belőlük.

A HEK-293 és HeLa sejteken elért transzfekeciós hatékonyságok 40-70% voltak. HUES9-en elért nukleofekciós hatékonyságok 10-15% voltak. Ugyanazon transzfekeciós kísérletsorban végzett transzfekeciók hatékonyságai alacsony variabilitást mutattak (3-6%).

4.4. Derepresszálo kezelések – transzgen csendesítettség vizsgálata

A HEK-293 sejten megfigyelhető transzfekeciót követő transzgen csendesítettség megállapítására trichostatin A (TSA) kezelést alkalmaztunk (Sigma-Aldrich). A gyári törzsoldatból abszolút etanollal 1000x törzsoldatot készítettünk, melyet a transzfekeciót követő 24. órában 300 nM koncentrációban, DMEM-ben oldva tettünk a sejtekre. Négy parallel transzfekecióból két lyukat kezeltünk, kettőre az oldószert tartalmazó DMEM-et tettük. Másnap, a transzfekeciót követő 48. órában az egyik lyukat RNS tisztításra használtuk fel (ld. alább), a másik lyukat FACS-on mértük. A kezeletlen kontroll tizedét tovább passzáltuk, a maradékból FACS-on szortoltuk a transzfekektált sejteket.

A dúsitott transzfekektált sejtpopulációkat standard módon fenntartottuk, és a transzgen csendesítettség megállapítására a hatodik hét elején 5-Aza-cytidine-nel kezeltük (Sigma-Aldrich). A vegyszerből százszoros törzsoldatot készítettünk, szérum- és antibiotikum mentes DMEM-ben oldottuk fel, majd 5 μ M koncentrációban tettük a sejtekre DMEM-ben. Ehhez előző nap $2,5 \times 10^4$ sejtet raktunk ki 12 lyukú lemezre sejtpopulációként négy lyukra (2 kezelt és 2 kezeletlen). A sejtek letapadását követően (másnap) kezdtük a kezelést, és négy napon át napi médiumcserével folytattuk. Negyedik napon az egyik lyukat RNS tisztításra használtuk fel, a másikat FACS-on mértük.

4.5. FACS analízis és szortolás

A GFP expresszálo sejteket FACSCalibur áramlási citométer készüléken analizáltuk (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, Egyesült Államok), Cellquest-Pro szoftver segítségével a gyártó utasításainak megfelelően (Becton, Dickinson and Company). Az analízisben transzfekektálatlan sejteket alkalmaztunk kontrollként, és a nem élő sejteket 5 μ g/mL propidium-jodiddal (Sigma-Aldrich) festettük, melyeket az analízisből kizártunk. A mérések

legalább 10 ezer élő sejtet vettek figyelembe. A GFP expresszáló sejtek szeparálására FACSria fluoreszcens sejt szorter készüléket alkalmaztunk a gyártó utasításainak megfelelően (Becton, Dickinson and Company).

4.6. qRT-PCR

RNS tisztítás, DNáz kezelés és cDNS átírás

A HEK-293 és HeLa sejt RNS tisztításokat ~90% konfluens 12 lyukú lemezről végeztük RNeasy Mini kit segítségével (Qiagen, Hilden, Németország). A lízis puffert közvetlen a sejtekre tettük rá, majd a gyártó utasításai szerint jártunk el. A tisztított RNS koncentrációját Eppendorf BioPhotometer Plus készüléken mértük (Eppendorf AG, Hamburg, Németország). Amennyiben a qPCR esszé miatt szükséges volt (GFP), a genomi DNS-t emésztéssel eltávolítottuk. 5 µg RNS-t 4 U DNase I enzimmel (New England Biolabs, Massachusetts, Egyesült Államok) emésztettük 20 µL-ben 10 U RNáz inhibitor jelenlétében (New England Biolabs), 1 órán át 37 °C-on. Ebből 1 µg RNS-t (4 µL) random oligonukleotidokkal 20 µL végtérfogóban átírtunk cDNS-sé a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően.

Primerek és PCR körülmények

A következő gyári TaqMan esszéket alkalmaztuk (Thermo Fisher Scientific): GAGE, Hs00275620_m1; béta aktin, Hs99999903_m1; béta 2 mikroglobulin, Hs99999907_m1. A GFP expressziójának mérésére a kópiaszám meghatározására használt TaqMan esszét alkalmaztuk (ld. alább). A reakciók összeméréséhez TaqMan Gene Expression Master Mix-et használtunk (Thermo Fisher Scientific). Az SB interakciós faktorok expressziójának méréséhez *SYBR green* kémiát alkalmaztunk, és az amplikonokat exon/exon határszekvenciákra terveztük az interneten elérhető Assay Design Center segítségével (www.lifescience.roche.com): HMGB1 (*high-mobility group protein B1*), for 5'- CATTGAGCTCCATAGAGACAGC, rev 5'- AGGATCTCCTTTGCCCATGT; DNAPKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*), for 5'- TTGAACACCATGTCCCAAGA, rev 5'- CTGACATTTTTTGTCAGCCAATC; Ku70, for 5'- AGAGTGAAGATGAGTTGACACCTTT, rev 5'- CCAAGAGATCTCGATCACTGCT; Ku80, for 5'- CATCTGATGCTACCAGATTTTGA, rev 5'- TCCATGCTCACGATTAGTGC; HSP90 (*heat shock protein 90*, endogén kontroll), for 5'- TGGATATCCCATTACT

CTTTTTGTG, rev 5'- TTCTTTTTCTTCTTCTTTGTCTTCCT. A reakciókban Power SYBR Green PCR Master Mix-et használtunk (Thermo Fisher Scientific), melybe a primereket 50 nM végkoncentrációban mértük be. A qPCR-eket triplikátumban mértük össze 20 µL-ben, melybe tízszeresére hígított cDNS-t tettünk (5 µL/reakció). Minden qPCR reakciót StepOnePlus *real-time* (valós idejű) PCR készüléken futtattunk (Thermo Fisher Scientific), és a standard expressziós vizsgálatokra ajánlott hőprofilot alkalmaztuk: 95 °C 10 perc, 40 ciklus 95 °C 15 másodperc és 60 °C 1 perc. A SYBR reakciók végén olvadáspont analízist végeztettünk. Az adatokat StepOne 2.1 szoftver segítségével (Thermo Fisher Scientific) analizáltuk, a kvantifikálásra $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztunk, ahol a hibásávokat 95%-os konfidencia intervallumra állítottuk be.

4.7. Transzpozon kópiaszám meghatározás

Genomiális DNS tisztítás

A kópiaszám meghatározáshoz sejtklonokat-, illetve átlagos kópiaszám mérésére transzfektált és szelektált sejtpopulációkat használtunk (ld. transzfekeciók). A klónokból és a szelektált sejtpopulációkból gDNS-t tisztítottunk, utóbbi esetben a parallel transzfekeciókból származó gDNS-eket egyenlő arányban összekevertük (púloztuk) az átlagos kópiaszám megállapítására. Alapanyagként 10^6 - 10^7 sejtet tripszinnel felszedtünk, majd centrifugáltuk (250 x g, 5 perc), a felülúszó eltávolítása után a sejtpelletből dolgoztunk, vagy -70 °C-ra tettük későbbi feldolgozásra. A sejteket 500 µL lízis pufferben (100mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 200mM NaCl) elkevertük, és hozzáadtunk 50 µL 5%-os SDS-t (nátrium-dodecil-szulfát), majd alaposan összekevertük. Hozzáadtunk 5 µL Proteináz K oldatot (10 mg/mL) (New England Biolabs) és 50 °C-on inkubáltuk egy órán át. Ha szövetből dolgoztunk, az elegyet 37 °C-on emésztettük éjszakán át. Az oldatot ezután fenol-kloroform vagy fenol-kloroform-izoamilalkohol eleggyel (Sigma-Aldrich) 1:1 térfogatarányban összekevertük, majd 10 másodperc vortexelést követően 5 percig centrifugáltuk 21000 x g sebességgel. A felső vizes fázist átpipettáztuk tiszta eppendorf csőbe, majd föl-le pipettázással összetörtük a viszkózus DNS-t, amit azután kloroformmal fenolmentesítettük: 1:1 térfogatarányban hozzáadtuk a kloroformot, majd 10 másodperc vortexelést követően 5 percig centrifugáltuk 21000 x g sebességgel. A felső vizes fázist óvatosan átpipettáztuk új csőbe. (Fontos, hogy az alsó fázis érintetlen maradjon.) Hűtőhideg izopropanollal 1:1 térfogatarányban kicsaptuk a DNS-t. A cső föl-le forgatásával kevertük az elegyet mindaddig, amíg a szálas csapadék láthatóvá vált. Ha nem látszott a kicsapódott DNS, állni hagytuk jégen 10

percig. A csapadékot 4 °C-on centrifugáltuk 10 percig 21000 x g sebességgel. A felülúszó leöntését követően jégre tettük a csövet és mostuk 500 µL hűtőhideg 80%-os etanollal, melyet frissen készítettünk. Amennyiben látható volt a csapadék, 5 percig állni hagyjuk jégen, majd ismételt centrifugálást követően az etanolt leszívtuk vagy leöntöttük. Tíz perces nyitott tetővel végzett szobahős szárítás után, maximális kiindulási mennyiség esetén ráértünk 150 µL vizet, majd a beoldódás elősegítésére 5 percig 80 °C-on inkubáltuk. Ezután föl-le pipetázással, majd alapos vortexeléssel elkevertük. A tömény DNS oldatot -70 °C-ra tettük és legkorábban másnap dolgoztunk tovább vele. A DNS koncentrációját a korábban említett fotométerrel megmértük, majd a továbbiakban 100 ng/µL-es hígított munkaoldatokkal dolgoztunk.

Primerek és PCR körülmények

A kópiaszám mérésekre használt esszék PCR-eit a Primer Express 3.0 szoftver segítségével terveztük (Applied Biosystems), a próbák fluoreszcens 5'-FAM-, valamint 3'-nem fluoreszcens (MGB – *minor groove binding*) kioltó jelölést kaptak. A primerek és a próbák a következők voltak: RPPH1 (RNáz P H1 RNS komponense, endogén kontroll), for 5'- AGCTGAG TGCGTCCTGTCACT, rev 5'- TCTGGCCCTAGTCTCAGACCTT, próba 5'- CACTCCCATGT CCCTT; GFP (*green fluorescent protein*), for 5'- GAGCGCACCATCTTCTTCAAG, rev 5'- TGTCGCCCTCGAACTTAC, próba 5'- ACGACGGCAACTACA; IRDR-L (*inverted repeat direct repeat - left*), for 5'- CTCGTTTTTCAACTACTCCACAAATTTCT, rev 5'- GTGTCATG CACAAAGTAGATGTCCTA, próba 5'- CTGACTTGCCAAAACT; IRDR-R (*inverted repeat direct repeat - right*), for 5'- GCTGAAATGAATCATTCTCTCTACTATTATTCTGA, rev 5'- AATTCCCTGTCTTAGGTCAGTTAGGA, próba 5'- TCACCACTTTATTTAAGAATGTG. A qPCR-eket targetenként triplikátumban 20 µL végtérfogatban mértük, TaqMan Gene Expression Master Mix-et használtunk (Thermo Fisher Scientific). A genomiális DNS-t 30-100 ng mennyiségben mértük be reakciónként, optimalizálást követően már 100 ng-ot alkalmaztunk. A reakciók a primereket és a próbákat 900-, illetve 250 nM töménységben tartalmzták. A kópiaszám meghatározásokat StepOne vagy StepOnePlus *real-time* PCR készüléken futtattunk (Thermo Fisher Scientific), és a standard expressziós vizsgálatokra ajánlott hőprofil alkalmaztuk: 95 °C 10 perc, 40 ciklus 95 °C 15 másodperc és 60 °C 1 perc. Az adatokat StepOne 2.1 szoftver segítségével (Thermo Fisher Scientific) analizáltuk. Optimalizálást követően a kvantifikálásra $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztunk, melyben egykópiás HEK-293 sejtklónokat használtunk referenciaként. A hibasávokat 95%-os konfidencia intervallumra állítottuk be.

4.8. Kvantitatív kivágási PCR

Plazmid tisztítás a transzfektált sejtekből

A sejtek a transzfekciót követő 48. órában kerültek további processzálásra. Az ekkor feltripszinezett maradékukat a paralelek összekeverését követően kivágási PCR-re használtuk. Kiindulásként 10^5 - 10^6 transzfektált sejtet centrifugáltunk (250 x g, 5 perc) és a sejt pelletből dolgoztunk tovább, vagy -70 °C-ra tettük későbbi feldolgozásra. A plazmid tisztítása QIAprep Spin Miniprep kittel történt (Qiagen), azzal a különbséggel, hogy a kitben található lízis puffer (P2) helyett 1,2%-os SDS-t (Sigma-Aldrich) alkalmaztunk, majd vortexelést és lepörgetést követően 5 μ L Proteináz K oldatot (10 mg/mL) (New England Biolabs) adtunk hozzá. Ismételt vortexelés és lepörgetés után a mintákat fél óráig inkubáltuk 50 °C-on. Ezt követően a gyártó utasításai szerint tisztítottuk a plazmidot, melyet 30 μ L vízzel eluáltunk az oszlopról.

Primerek és PCR körülmények

A transzpozon donor plazmidból történő kivágódás mérésére a plazmid szekvenciájára specifikus primereket alkalmaztunk, melyek kizárólag a kivágáson és sejtes javításon átesett, recirkularizált plazmidról adnak PCR terméket a transzpozon nagy mérete miatt (**22. ábra**). Egymásba ágyazott két körös (*nested*) PCR-t alkalmaztunk, melyben a második PCR körben végeztünk kvantifikálást *SYBR green* kémiát alkalmazva. Az első PCR kört a következő primerekkel végeztük: for 5'- GCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGG, rev 5'- TCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTC. A reakciót 20 μ L-ben mértük össze PCR Master Mix-el (Promega, Madison, Wisconsin, Egyesült Államok), mely a primereket 200 nM koncentrációban tartalmazta. A tisztított plazmid 1 mikroliterét adtuk hozzá, és 10-25 ciklusszámmal (alkalmanként optimalizálandó) végeztük az előamplifikálást, melynek hőprofilja a következő volt: 94 °C fél perc, 60 °C 15 másodperc és 72 °C 1 perc. Az első kör PCR termékéből ezerszeres hígítást végeztünk, majd ennek 5 μ L-ét mértük be a következő kivágási qPCR körbe, valamint az endogén kontrollként alkalmazott ampicillinről amplifikáló qPCR-be. A reakciókat 20 μ L-ben mértük össze targetenként triplikátumban, melynek primerei a következők voltak: kivágási PCR (második kör), for 5'- CAGCTGGCACGACAGGTTTCCCG, rev 5'- CGATTAAG TTGGGTAACGCCAGGG; ampicillin (endogén kontroll), for 5'- TTTGCTCACCCAG AAACGC, rev 5'- AGTTGGCCGCAAGTGTATCAC. A reakciókban Power SYBR Green PCR

Master Mix-et használtunk (Thermo Fisher Scientific), melybe a primereket 50 nM végkoncentrációban mértük be. A qPCR-eket StepOnePlus *real-time* PCR készüléken futtattuk (Thermo Fisher Scientific), és a standard expressziós vizsgálatokra ajánlott hőprofil alkalmaztuk: 95 °C 10 perc, 40 ciklus 95 °C 15 másodperc és 60 °C 1 perc. A reakciók végén olvadáspont analízist végeztünk. Az adatokat StepOne 2.1 szoftver segítségével (Thermo Fisher Scientific) analizáltuk. Optimalizálást követően a kvantifikálásra $\Delta\Delta Ct$ módszert alkalmaztunk, ahol a hibasávokat 95%-os konfidencia intervallumra állítottuk be.

4.9. SB integrációs helyek meghatározása

Az integrációs helyek meghatározására splinkerette PCR technikát alkalmaztunk. A genomiális DNS restrikciós emésztését követően kompatibilis túlnyúló véggel rendelkező duplaszálas *linker*-rel végeztünk ligálást, majd egymásba ágyazott (*nested*) PCR-el amplifikáltuk a transzpozon genomi környezetét, ahol az egyik primer a linkerre specifikus, míg a másik az IRDR-L vagy IRDR-R szekvenciákra. A *linker* rövid antiszensz szálának mindkét vége módosított. Ennek köszönhetően a duplaszálas *linker* nem tud önmagával összeligálódni, és csak a szensz szál kapcsolódik az emésztett genomi DNS végekre. A módosítás miatt a szabadon maradó rövid antiszensz szál 3' vége sem tud primerként működni a ligálást követő PCR reakciókban.

Genomi DNS emésztése és linker ligálása

A New England Biolabs enzimeit és puffereit használtuk. A genomiális DNS-ből 2 μg -ot emésztettünk 100 μL -ben NEBuffer 4-ben 20 U BfaI és 20 U NdeI enzimekkel 37 °C-on, egy éjszakán át. Az enzimeket ezt követően 80 °C-on 20 percig hőinaktiváltuk. Az elegyet kiegészítettük BSA-val (*bovine serum albumin*) és 30 mM Tris-el, valamint 50 mM NaCl-al, majd hozzáadtunk 20 U AseI enzimet és 3 órán át emésztettük 37 °C-on. Mindegyik enzim azonos 5' túlnyúló véget hoz létre. Ezt követően az oldatot fenol-kloroform-izoamilalkohol eleggyel (Sigma-Aldrich) 1:1 arányban összekevertük, 10 másodperces vortexelés után 5 percig 21000 x g sebességgel centrifugáltuk, majd a felső vizes fázist átpipettáztuk másik csőbe. Fenolmentesítettük kloroformmal, melyet szintén 1:1 arányban adtunk. 10 másodperces vortexelés után 5 percig centrifugáltuk 21000 x g sebességgel, majd a szerves fázis érintése nélkül a felső vizes fázist átpipettáztuk másik csőbe. Ezután 1:1 arányban hozzáadott hűtőhideg izopropanollal kicsaptuk az emésztett DNS-t. Föl-le pipettázással kevertük el az elegyet, majd -70

°C-ra tettük éjszakára. Másnap 4 °C-on centrifugáltuk 10 percig 21000 x g sebességgel szögrotoros centrifugában, ahová a csöveket azonos orientációban tettük be. Ezt követően pipettával leszívtuk az izopropanolt ügyelve, hogy a csapadék várható kitapadási helyét ne érintsük. Ezután 200 µL frissen készített 80%-os etanolt mértünk rá óvatosan, hogy a csapadékot ne sodorjuk le, majd ismételtük az előző centrifugálást. (A csöveket az előzővel azonos orientációban helyeztük a centrifugába.) A centrifugálás után pipettával leszívtuk az etanolt nem érintve a csapadék várható helyét, és 10 percig szobahőmérsékleten szárítottuk a csövet, majd a kicsapott DNS-t 25 µL vízben feloldottuk.

A *linker* szensz és antiszensz szárait félszeres töménységű NEBuffer 2-ben hibridizáltuk 10 µM koncentrációkban, melyhez fűtőblokkban 96 °C-on inkubáltuk az elegyet 2 percig, majd felforralt vízbe tettük és hagytuk magától kihűlni éjszakán át. A *linker* dupla szál vége a BfaI emésztett DNS véget utánozza. A *linker*-ek szekvenciái: szensz 5'- GTAATACGACTCACT ATAGGGCTCCGCTTAAGGGAC, a két végén módosított antiszensz 5'- P-TAGTCC CTTAAGCGGAG-amino. A ligálási reakciót 25 µL-ben mértük össze T4 ligáz pufferben: 20 U T4 ligázzal, 2 µL emésztett és kicsapott gDNS-el, és 4 µL dupla szál *linker*-rel. A reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten hagytuk.

Primerek és PCR körülmények

Mindkét kört 20 µL térfogatban mértük össze PCR Master Mix-el (2x töménység) (Promega) 1 µM primer koncentrációk mellett. Az első körbe 3 µL ligátumot mértünk be, ennek primerei a következők voltak: *linker*, 5'- GTAATACGACTCACTATAGGGC; IRDR-L, 5'- TTTCCAAGCTGTTTAAAGGCAC; IRDR-R, 5'- GTCAGGAATTGTGAAAAAGTGAG. A második PCR körbe az első termék 1 µL-ét mértük be, ennek primerei a következők voltak: *linker*, 5'- AGGGCTCCGCTTAAGGGAC; IRDR-L, 5'- CCTAACTGACTTGCCAAAAC; IRDR-R, 5'- GGCTAAGGTGTATGTAACTTCCG.

„Touch-down” PCR hőprofil alkalmaztunk:

1. kör:

94 °C – 5 perc, majd 15x:

94 °C – 30 mp

65 °C – 30 mp

72 °C – 30 mp, majd 5x:

94 °C – 30 mp

63 °C – 30 mp

72 °C – 2 mp + 2 mp/ciklus, majd 5x:

94 °C – 30 mp

60 °C – 30 mp

72 °C – 12 mp + 2 mp/ciklus, majd 5x:

94 °C – 30 mp

58 °C – 30 mp

72 °C – 22 mp + 2 mp/ciklus, majd 5x:

94 °C – 30 mp

55 °C – 30 mp

72 °C – 30 mp

72 °C – 5 perc

2. kör:

94 °C – 5 perc, majd 10x:

94 °C – 30 mp

63 °C – 30 mp

72 °C – 1 perc, majd 20x:

94 °C – 30 mp

55 °C – 30 mp

72 °C – 1 perc

72 °C – 5 perc

Szekvenálás

A PCR termékeket 1,2%-os agaróz gélen futtattuk, mely etídium-bromidot tartalmazott. A terméket UV vizualizáció mellett gélből kivágtuk és NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kittel tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően (Macherey-Nagel, Düren, Németország). A tisztított PCR termék koncentrációját fotométerrel megmértük, majd 20 ng termékből szekvenáló reakciót mértünk össze BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit segítségével a gyártó utasításainak megfelelően (Thermo Fisher Scientific). A szekvenáló reakciót DyeEx 2.0 Spin kittel tisztítottuk (Qiagen). A tisztított mintából összemértünk 5 µL-t 15 µL formamiddal, 95°C-on 2 percig denaturáltuk, majd szekvenáltuk ABI310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) segítségével.

4.10. Statisztika

A qPCR-es mérések hibáit a standard hibaterjedési törvények alapján számítottuk, vagy a StepOne 2.1 szoftver kalkulálta [258]. A Vstep görbe karakter eloszlásokat a vassarstats.net segítségével hasonlítottuk össze.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Transzgén expressziójának és csendesülésének vizsgálata SB transzpozonos rendszerrel transzfektált sejtpopuláción

Az SB transzpozon *in vitro* génterápiás alkalmazását HEK-293 sejten modelleztük. Két különböző promóterrel rendelkező EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) markert expresszáló transzgént alkalmaztunk, a transzpozon IRDR szekvenciák CAG-EGFP, illetve CMV-EGFP expressziós kazettát határoltak a donor plazmidokban (12. ábra). A sejteket a túltermeléses gátlás kiküszöbölése érdekében az irodalomban ajánlott 10:1 arányú transzpozon donorral, illetve SB100X transzpozáz kifejező *helper* vektorral transzfektáltuk. A génbevitel kontrollálására a transzpozáz expressziós vektor helyett egy indifferens plazmiddal egészítettük ki a transzfektált donort.

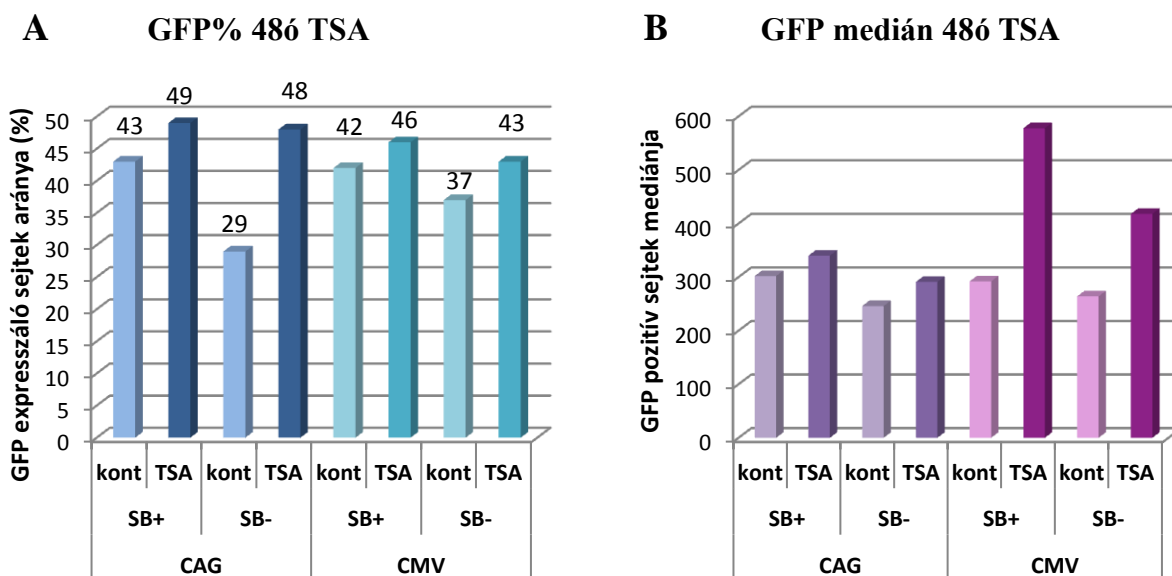


12. ábra. Transzgén expressziójának és csendesülésének vizsgálatára alkalmazott transzfekciós kísérleti rendszer.

GFP-t expresszáló CAG és CMV promóterrel rendelkező SB transzpozon kazettákat alkalmaztunk parallel transzfekciókban, melyekhez az SB100X *helper*-t 10:1 arányban kotranszfektáltuk (SB+), illetve kontrollként más plazmiddal helyettesítettük (pl. mutáns transzpozázal, SB-). CMV, citomegalovírus promóter; CAG, CMV *enhancer* – *chicken β -actin* – *rabbit β_1 -globin* promóter; pA, poliadenilációs szignálszekvencia.

A transzfektált sejtek dúsítására a transzgén tranziens expressziója alapján van lehetőség, melyet a génterápiás alkalmazásokban is megkísérelnek, és amelyhez viszonylag erős expresszióra van szükség. Utóbbi a stabil génterápiás hatás kiváltása szempontjából is fontos lehet, ezért alkalmaztunk a modellrendszerünkben erősnek mondható promótereket. Elsőként tehát a dúsíthatóságot meghatározó tranziens expressziót és annak epizómális csendesülését vizsgáltuk. Transzfekciót követő 24. órában trichosztatin A (TSA) kezelést alkalmaztunk, melynek eredményét a 48. órában analizáltuk áramlási citométeren (FACS). A TSA egy hiszton-deacetiláz gátló vegyület, derepresszáló hatása hamar jelentkezik, melyhez nincs szükség DNS replikációra. A tranziens marker expresszió a transzfektált sejtek 9-14%-ában csendesült (13A.

ábra), a négyféle transzfelecióból egyetlen esetben jelentősebb csendesülést kaptunk (40%), mely talán sztochasztikusnak mondható. A FACS analízis lehetőséget ad arra is, hogy a GFP-t expresszáló sejtpopuláció GFP intenzitásának átlagát vizsgáljuk. A CMV-GFP donorral történő transzfeleciókban jelentősebb intenzitásbeli csendesülést tapasztaltunk (**13B. ábra**).



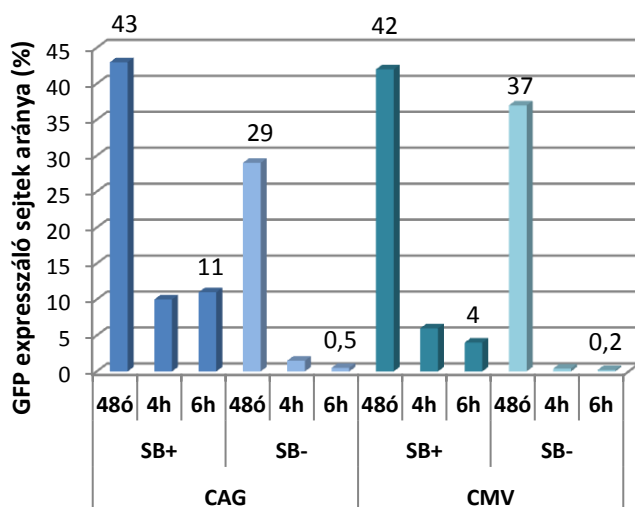
13. ábra. Tranziens markerexpresszió csendesülésének vizsgálata HEK-293 sejten, 48 órával a transzfeleciót követően TSA kezelés után.

GFP transzpozonnal kotranszfelektált sejtek GFP expressziójának FACS analízise 48 óránál TSA-val kezelt, illetve kezeletlen kontroll esetben. **(A)** GFP-t expresszáló sejtek százalékos aránya. **(B)** Sejtek GFP intenzitásának mediánja. Az ábrán egy reprezentatív mérés eredményei láthatók.

A kezeletlen sejtek egy részét dúsítás nélkül tartottuk fent hosszabb távon, és vizsgáltuk a marker stabil beépülését annak expresszióját tesztelve (**14. ábra**). A transzgenikusnak mondható GFP-t expresszáló sejtek aránya a hatodik hétre a CAG-GFP esetén 10-, a CMV-GFP esetén 4%-át tette ki a dúsítatlan populációnak amellet, hogy a tranziensen expresszáló sejtek aránya hasonló volt (43- és 42%). Ezzel szemben az inaktív kontroll transzfeleciókból fenntartott sejtpopulációk elhanyagolható mértékben tartalmaztak GFP-t expresszáló sejteket a hatodik hétre.

A kezeletlen sejtek másik részét a transzfeleciót követő 48 óra elteltével a tranziens GFP expresszió alapján FACS segítségével szelektáltuk (szortoltuk), melyet azután a 6. héten vizsgáltunk a marker beépülésére – expressziójára, valamint annak csendesülésre. 5-Aza-cytidine-nel (Aza) kezeltük a sejteket 4 napig, majd a kezelés eredményét szintén FACS-on vizsgáltuk. Az Aza egy citozin analóg, fő hatásmechanizmusa során beépül a DNS-be és a DNS metil transzferáz 1-et gátolja, mely a DNS metiláció fenntartásáért felelős. A dúsított sejtek jelentős GFP expressziós különbséget mutattak a 6. héten (**15A. ábra**). A CAG-GFP expresszió aránya 86%,

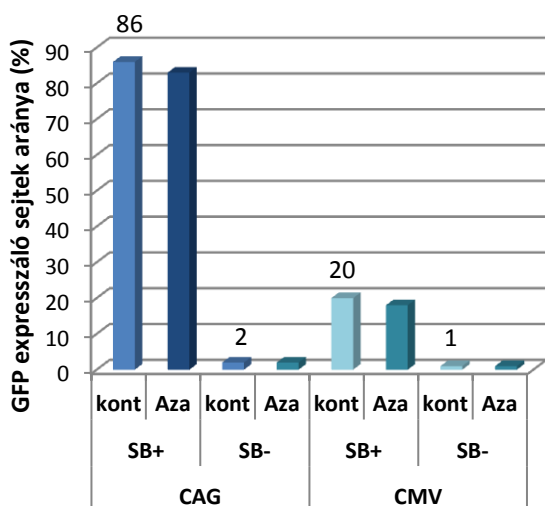
míg a CMV-GFP expresszió aránya csak 20% annak ellenére, hogy a tranziens expressziós arányok hasonlóan jók voltak.



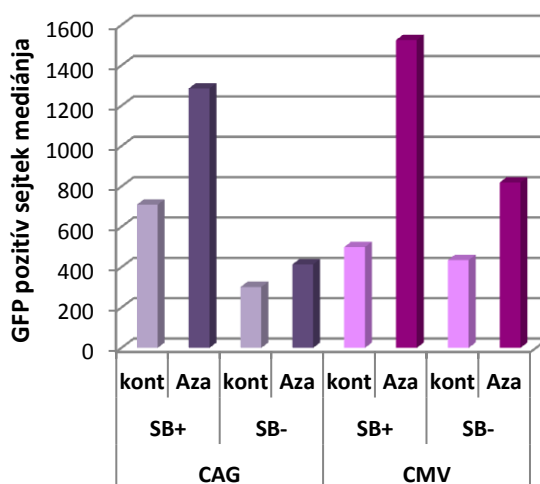
14. ábra. Dúsítatlan sejt populáció expressziós követése transzpozonos markerbevitelt követően 6 hétig.

GFP expresszáló SB transzpozonos rendszerrel (SB100X) kotranszjektált sejt populáció GFP expressziójának követése FACS-on. CAG / CMV: a transzgen expressziós kazettákban található promóterek, SB+ / SB-: aktív transzpozázssal és nélküle végzett transzjektációs kísérletek.

A Dúsított GFP% 6. hét Aza



B GFP medián 6. hét Aza

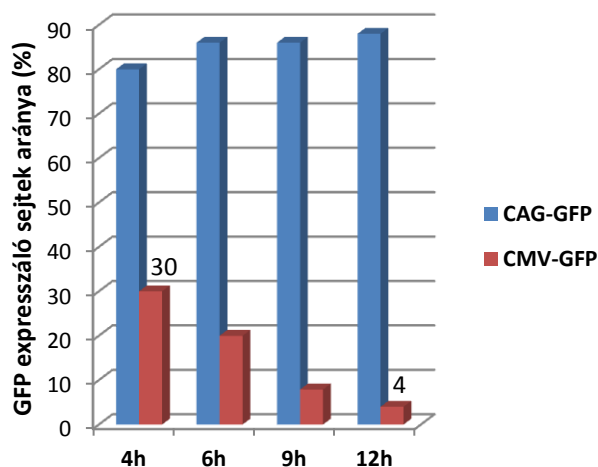


15. ábra. Transzgenikus expresszió és csendesülés vizsgálata transzjektált sejtek tranziens expressziója alapján dúsított sejteken a 6. héten.

48 óránál FACS-on leválogatott GFP pozitív sejteket továbbtenyésztettük, majd a 6. héten FACS-szal analizáltuk az Aza-val kezelt, illetve a kontroll esetekben. (A) GFP-t expresszáló sejtek százalékos aránya. (B) Sejtek GFP intenzitásának mediánja. Az ábrán egy reprezentatív mérés eredményei láthatók.

Mindez felveti annak a lehetőségét, hogy a CAG-GFP transzpozonnal ellentétben a CMV-GFP esetében kevésbé volt hatékony a transzpozonos génbevitel. Az Aza kezelés hatására egyik esetben sem emelkedett a GFP-t expresszáló sejtek aránya. Ezért elmondhatjuk, hogy a transzgenikus sejtek egyikében sem tapasztaltunk teljes marker expresszió csendesülést, annak ellenére, hogy erős promótereket alkalmaztunk. Az expresszáló sejtek átlagos GFP intenzitása azonban mind a CAG-GFP-, mind a CMV-GFP esetén csendesülést mutatott (**15B. ábra**).

A dúsított és kezeletlen sejtpopulációk transzgén expressziójának megtartását még hosszabb távon vizsgáltuk. Azt teszteltük, hogy egy populációs növekedési dinamikában mennyire jelenthet szelekciós hátrányt a transzgén expressziója a sejtek számára. A 12. hétig követtük a populációkat, és azt tapasztaltuk, hogy a CAG-GFP transzgén változatlan magas arányban expresszálódott a sejtekben, míg a CMV-GFP fokozatos csökkenést mutatott a negyedik hétről a 12. hétre, 30%-ról 4%-ra (**16. ábra**). Ez a tendencia a CMV-GFP esetén utalhat a 4. hetet megelőző korábbi szelekciós dinamikára, ahol a kezdeti esetlegesen jó hatékonyságú génbevitelt követően az expresszáló sejtek aránya hasonló exponenciális csökkenésen mehetett keresztül.

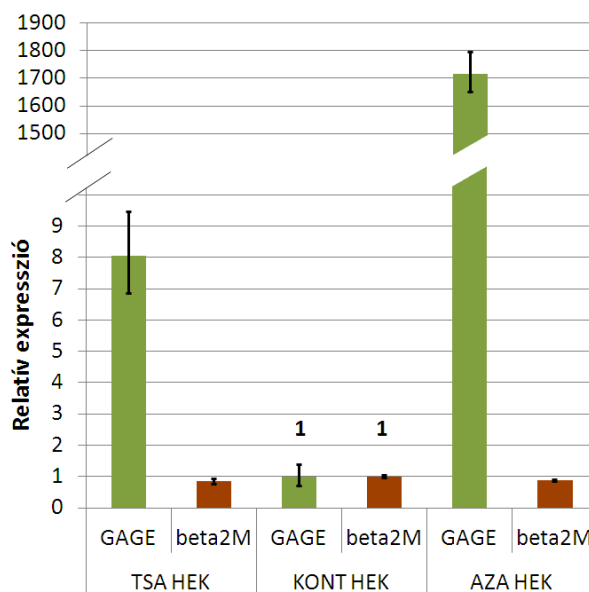


16. ábra. Tranziens expresszió alapján dúsított sejtek expressziójának hosszú távú követése 12 hétig.

GFP expresszáló SB transzpozonos rendszerrel kotranszfektált majd tranziens expresszió alapján 48 óránál GFP-re szortolt sejtpopuláció GFP expressziójának követése.

A derepresszáló kezelések hatásosságát (az Aza, illetve a TSA működését) a transzfektált sejtek kezelésével párhuzamosan mind a transzfektált, mind nem transzfektált sejteken teszteltük. Olyan gén expresszióját vizsgáltuk (GAGE – G antigén), mely normális szabályozás mellett kizárólag herében expresszálódik, minden más sejtben a fejlődés során csendesül [259]. TaqMan qRT-PCR-t alkalmaztunk két különböző endogén kontroll gén mellett (béta aktin és béta 2 mikroglobulin) (**17. ábra**). Az ábrán a transzfektálatlan sejteken tesztelt kezelési hatás látható, mely TSA esetén néhányszoros (5-8-szoros), Aza esetén minimum ezerszeres GAGE expressziós emelkedést eredményezett. A derepresszáló kezelések GFP expressziókra gyakorolt indukáló hatását qRT-PCR-rel mRNS szinten is megerősítettük. Az mRNS-t a vegyes sejtpopulációkból

mértünk, így ezek eredménye a GFP pozitív populációk expressziós összehasonlítására nem informatív, mindazonáltal az indukáló hatás detektálható volt.



17. ábra. Csendesülést gátló kezelések hatásosságának ellenőrzése qRT-PCR-el.

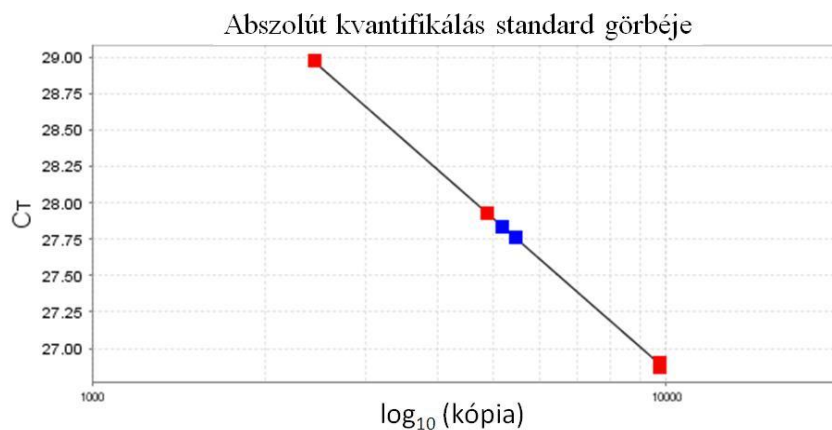
Derepresszáló TSA és Aza kezelés hatásának tesztelése G antigén (GAGE) expressziós vizsgálatával, mely gén normál szabályozás mellett a herét kivéve minden sejtben csendesül. Béta aktinra normalizálva a béta 2 mikroglobulin szintje nem változott a kezelés hatására. Az ábrán egy reprezentatív mérés eredménye látható, az értékek három párhuzamos mérés átlagát mutatják. A relatív kvantifikálás TaqMan esszével $\Delta\Delta C_t$ módszerrel történt, a hibásávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

5.2. Transzpozonos rendszer génbevitelben mutatott aktivitásának mérésére alkalmas módszerek beállítása

5.2.1. Integrálódott transzpozon egy sejtre jutó kópiaszámának mérése

A legnagyobb nehézség egy kópiaszám mérés beállításánál, hogy megfelelő ismert kópiaszámú kontroll mintára tegyünk szert. Ha nem állnak rendelkezésre olyan minták, melyek kópiaszámát más módszerrel már meghatározták, egyetlen kópiát tartalmazó sejteket a véletlenszerű beépülések izolálásával nyerhetünk. A GFP-t expresszáló SB transzpozon donor plazmidot önmagában transzfektáltuk HEK-293 sejtekbe, és a véletlenszerű beépüléseket FACS segítségével kiválogattuk, majd sejteket izoláltunk és klónokat hoztunk létre. A cirkuláris plazmid véletlenszerű törésével a DNS javító rendszer többségében alacsony kópiaszámú (1-2) integrációkat hoz létre. Az első kérdésünk tehát az volt, vajon lehetséges-e a GFP-re tervezett TaqMan qPCR esszével a GFP-t biztosan tartalmazó transzgént a legkisebb, egyetlen

kópiaszámban megmérni ezekből a klónokból. Abszolút kvantifikálást végeztünk, melyet a minta gDNS bemérésére alapoztunk, és a mintából kapott Ct értéket standard görbére illesztettük. A standard görbét a linearizált transzpozon donor plazmid ismert kópiaszámú bemérésével és hígítási sorával hoztuk létre, a várhatóan egy kópiához igazítottuk a plazmid bemérést. 30 ng gDNS esetén egy egykópiás klón diploid sejtenként összesen 4780 kópiaszámot és ugyanennyi diploid genomot reprezentál a PCR bemérése során. Ennek megfelelő plazmid hígítást végeztünk, ahol a standard görbének pontosan a középső tartománya adta a mintával ekvivalens bemérési pontot. Kétszeres hígítási lépésekkel összesen három pontot vettünk fel, melynek eredményeként jó közelítéssel egyetlen Ct érték eltéréseket kaptunk a standard görbe pontjai között (**18. ábra**). A várhatóan egykópiás klón leolvasott kópiaszámából sejtenkénti kópiát számoltunk. A mérés egy reprezentatív példája látható a 28 ábrán, ahol a kapott kópiaszám: $(5317 \pm 195) / 4780 = 1,09 \pm 0,04$.

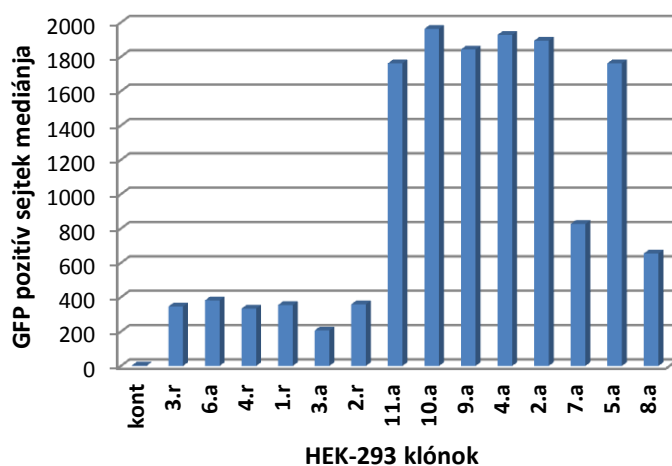


18. ábra. GFP transzgén tartalmazó SB transzpozon random integrációját követően GFP-t expresszáló HEK-293 klón genomiális kópiaszámának meghatározása abszolút kvantifikálással a GFP szekvenciája alapján (qPCR).

Várhatóan egykópiás klón validálása plazmid standard görbe segítségével. A kvantifikálás alapja a minta gDNS bemérése (4780 diploid sejt genom). A várt kópiaszámhoz igazítottuk a plazmid görbe középső bemérési pontját. Piros pontok a plazmid Ct értékek, kék pontok a mintából mért értékek.

Az abszolút kvantifikálás a GFP esszé segítségével igazolta, hogy ez az esszé alkalmas a kópiaszám megbízható meghatározására, ám az abszolút kvantifikálás reprodukálhatósága elég rossznak bizonyult. Esetenként 0,5-, máskor 1,5 kópiát adott sejtenként ugyanarra a random integrálódott klónra. Az abszolút kvantifikálás pontossága elsősorban a standard görbe minőségén múlik, másodsorban a minta DNS minőségén, amennyiben annak DNS bemérésére alapozzuk a mérést. A minta DNS bemérése, illetve működőképessége endogén kontroll esszével kontrollálható. Ebben az esetben azonban az endogén kontroll kópiaszámát is abszolút

kvantifikálással és újabb standard görbével kellene meghatároznunk, melyekhez sokszoros hígítást kell végrehajtanunk több lépésben. A plazmid hígítások és bemérések hibái az eredményben összeadódnak, az endogén kontrollra vonatkoztatott kópiaszámban sokszorozódik a hiba. A relatív kvantifikálás jobbnak ígérkezett a rutinszerű használatra, ahol ismert kópiájú mintát alkalmaznak referenciaként, melyre például az előbbieken meghatározott 1 kópiás random beépüléssel kapott klón is alkalmas lehet. A relatív kvantifikáláshoz még több GFP transzpozont tartalmazó klónra volt szükségünk. Ezért mind a random beépülésekre, mind az aktív transzpozíció eredményeként várhatóan több kópiás beépüléseket is tartalmazó sejtpopulációra is dúsítottunk és sejteket izoláltunk. Az így kapott klónok GFP intenzitását FACS segítségével összehasonlítottuk (**19. ábra**). Jól látható, hogy a random integráció klónjai (3.r, 4.r, 1.r, 2.r) és néhány transzpozonos – aktív – integráció eredményeként kapott klón is (6.a, 3.a) hasonlóan alacsony GFP intenzitást produkált a várhatóan egykópiás transzpozon tartalomnak megfelelően (**19. ábra**).



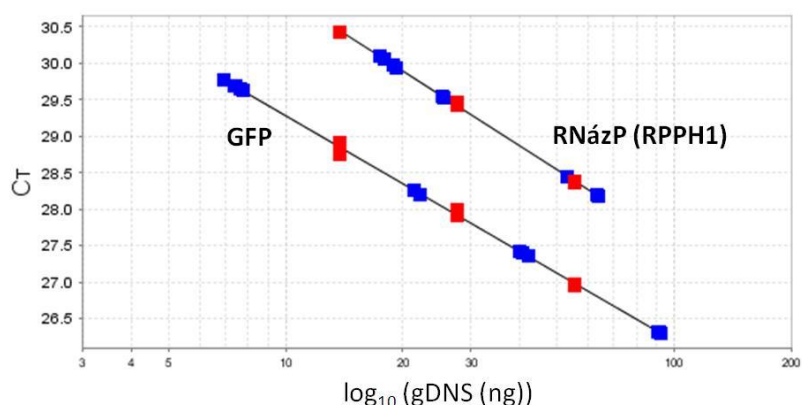
19. ábra. CAG-GFP kazettájú SB transzpozont tartalmazó HEK-293 klónok GFP expressziós intenzitásainak összehasonlítása.

GFP transzpozonnal transzfektált, majd transzgén expressziója alapján FACS-on szortolt sejtpopulációkból izolált klónok GFP intenzitásainak mérése FACS-on. Transzpozázzal kotranszfektált aktív (#.a), és transzpozáz nélkül transzfektált (#.r) sejtpopulációkból származnak a klónok.

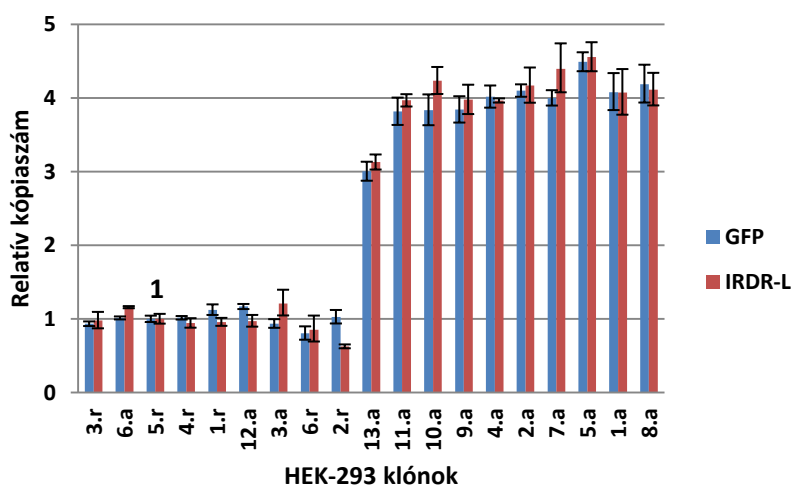
A nem optimális PCR hatékonyság problémájának kiküszöbölésére továbbra is standard görbét alkalmaztunk. A GFP kópiaszámát relatív standard görbe módszerrel határoztuk meg, melyhez az adott reakcióplétre felmérendő gDNS minták egyenlő arányú keverésével (púlozásával) állítottuk elő a standard görbét. Ez garantálta, hogy az egyes minták Ct értékei jó eséllyel rajta lesznek a standard görbén, melynek közepe szintén a 30 ng gDNS bemérési pontot

adta, és kétszeres hígítással három pontot vettünk fel. Ebből a gDNS hígítási sorból mind a GFP-re mind az endogén kontrollra (RNáz P – RPPH1) felvettük a standard görbét, ahol szintén egyetlen Ct érték különbségeket kaptunk a kétszeres hígítási pontok között (**20A. ábra**).

A GFP relatív kvantifikálásának standard görbéi



B GFP és IRDR-L kópiaszámok



20. ábra. Több CAG-GFP transzgén expresszáló SB klón kópiaszámának meghatározása relatív standard görbe módszerrel, egykópiás klónt használva referenciaként.

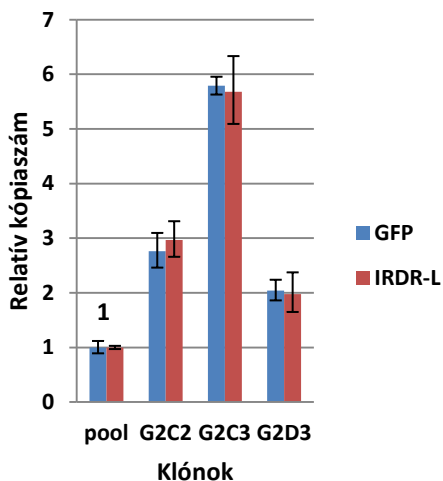
A minták Ct értékeit a mintákból púlozott gDNS-ből készített standard görbére illesztettük, és a leolvasott target értékeket az endogén kontrollra történő normalizálást követően az egykópiás referencia mintához hasonlítottuk, melyet abszolút kvantifikálással korábban validáltunk. (A) GFP target és RNáz P endogén kontroll standard görbéi. Piros pontok a standard görbék Ct értékei, kék pontok a mintákból mért értékek. (B) Relatív kvantifikálás eredménye a GFP és IRDR-L szekvenciákra. Az értékek három párhuzamos mérés átlagát mutatják, a hibásávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

A minták Ct-ít a standard görbékre illesztve a relatív standard görbe módszer a púlozott gDNS ng-jának megfelelő mennyiségeket olvasott le. A program először minden mintát az endogén kontrollra normalizál: a leolvasott GFP-t elosztja a szintén leolvasott endogén kontrollal. Az adott mintára így kapott mennyiséget a megadott referencia minta normalizált mennyiségével szintén elosztja, miközben a mérések hibáinak terjedését is kalkulálja. Az abszolút kvantifikálással egykópiásnak bizonyult klónt vettük referenciának, a relatív standard görbe módszerrel a GFP-re kapott kópiaszámok pedig jól korreláltak a GFP intenzitással (**20B. ábra**). Az alacsony intenzitású klónok kópiaszáma egynek bizonyult, míg a magas intenzitást mutató klónok kópiaszámára többségben 4-et kaptunk. Az azonos kópiaszámú GFP intenzitások mutattak némi varianciát (3.a, 7.a, 8.a) feltehetően az integrációk expresszióra gyakorolt pozicionális hatása miatt. Ugyanezen klónok kópiaszámát relatív standard görbe módszerrel a bal transzpozon szekvenciára (IRDR-L) tervezett TaqMan esszével is meghatároztuk, amely jól egyezett a GFP-re kapott kópiaszámokkal (**20B. ábra**).

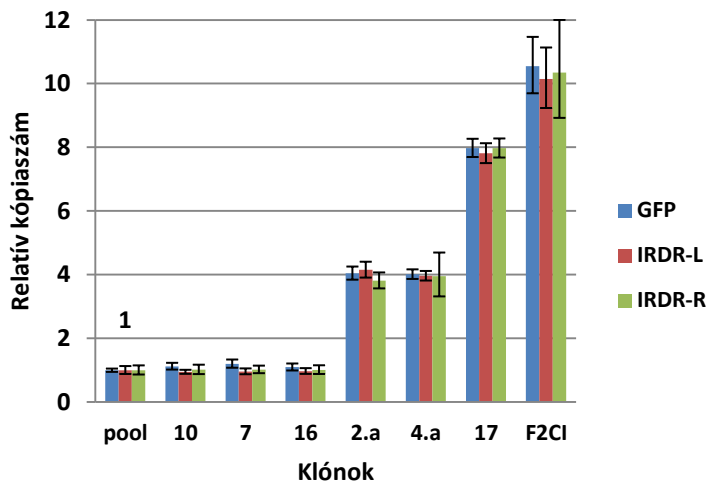
A relatív standard görbe módszer alkalmazása mellett gyakran kaptunk jó PCR hatékonyságokat az egyes TaqMan esszékre (GFP, IRDR-L, RNázP), amely a standard görbe meredekségével kontrollálható. A program által illesztett egyenes egyenletéből [$Ct = m \cdot \log_{10}(\text{bemérés}) + a$], maximális hatékonyság esetén a meredekség: $m = -3,32$. A hatékonyság visszaszámolható a meredekség segítségével: $\text{Efficiency} = 10^{(-1/m)} - 1$. Teljes hatékonyság mellett ($\text{Efficiency} = 1$) minden egyes ciklusban duplázódik a termék, ami azt is jelenti, hogy a kétszeres hígítási pontok között pontosan egy Ct érték különbség adódik. Ha az egyes esszék hatékonysága jó, nincs szükség a standard görbére, mert a minta és a referencia target Ct érték különbsége elegendő a bemért kópiák rátájának meghatározásához [260]. Az adott mintával bemért target relatív mennyisége a referencia mintához képest (RQ – *relative quantity*): $RQ = 2^{-\Delta Ct}$. Hasonlóan számolható a bemért endogén kontroll rátája a minta és a referencia Ct értékeinek különbségével. Utóbbi mondja meg, hogy hányszor több vagy kevesebb gDNS-t mértünk be az adott mintából a referencia mintához képest. A két RQ hányadosa adja a target referencia mintára vonatkoztatott relatív kópiaszámát: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Mivel a $\Delta\Delta Ct$ módszerrel ugyanazokat a kópiaszámokat kaptuk, mint a relatív standard görbe módszerrel, elhagytuk a hígítási sorokat, és így jóval több mintát tudunk egymás mellett rutinszerűen analizálni. Referenciaként pedig egykópiás klónok púlozott DNS-ét alkalmaztuk. A módszer megbízható működését többféle kópiaszámú, más SB transzpozont tartalmazó egyéb humán sejtek klónjainak mérése igazolta (**21A. ábra**), ahol a különböző klónokra kapott kópiaszámok diszkrét eloszlása mutatja, hogy az egész kópiák jól elkülöníthetők egymástól. Az optimális gDNS mennyiség 90-100 ng-nak bizonyult, ekkora mennyiség bemérése

mellett számottevően javult az IRDR-L-re kapott kópiaszám reprodukálhatósága, valamint az addig kevésbé jól működő jobb transzpozon (IRDR-R) szekvenciára tervezett esszé eredménye is megbízhatóvá vált, és szintén korrelált a többi szekvenciára kapott kópiaszámokkal (**21B. ábra**).

A Humán embrionális őssejt klónok



B Vegyes klónok



21. ábra. Többféle kópiaszámú különféle SB transzpozont tartalmazó klón kópiaszámának meghatározása $\Delta\Delta Ct$ módszerrel, egykópiás klónokból púlozott mintát használva referenciaként.

(A) Humán embrionális őssejt klónok kópiaszáma GFP és IRDR-L esszékkel. (B) Vegyes klónok kópiaszám eredménye GFP, IRDR-L és IRDR-R esszékkel. Az ábrákon reprezentatív mérések láthatók, az értékek három párhuzamos mérés átlagát mutatják, a hibaszávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

Az transzpozon belső szekvenciális tartalmától független IRDR-L esszé és a $\Delta\Delta Ct$ módszer működőképességét olyan SB transzpozon tartalmú mintákon is teszteltük, melyek kópiaszámát hagyományos módszerekkel már korábban meghatározták. Ilyen módszerek a Southern blot, dot blot, illetve az integrációk azonosítására is alkalmas transzpozon display, splinkerette PCR, vagy inverz PCR módszerek. Számos ilyen alacsony és magas kópiaszámú (1-50) klónon teszteltük a módszerünket, és az általunk mért qPCR-es kópiaszám szinte minden esetben egyezett az egyéb módszerek eredményeivel, még a magasabb kópiaszámok esetén is viszonylag alacsony ($\leq 9\%$) relatív különbséget kaptunk (**2. táblázat**).

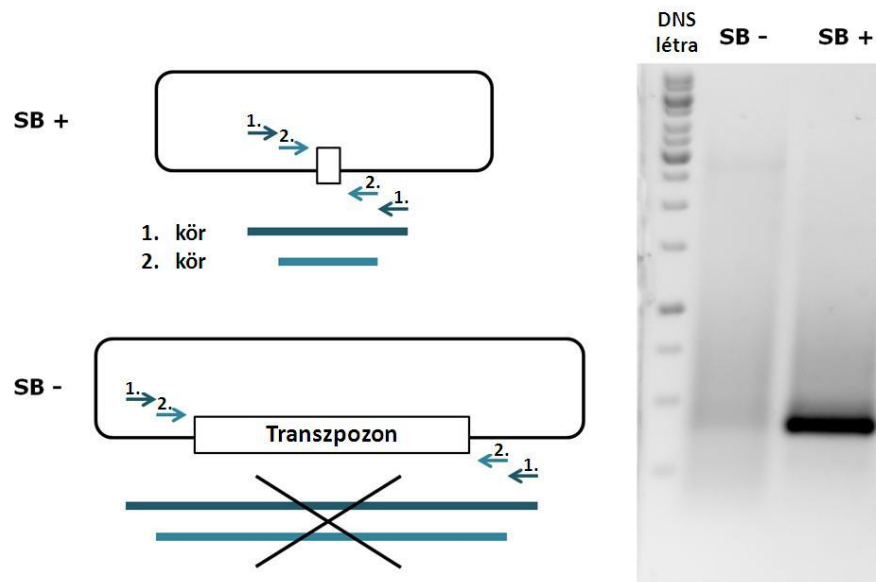
Klón	Hagyományos módszerek	Kópiaszámok	
		Hagyományos módszerekkel	IRDR-L qPCR-el
2/1	Transposon display/Southern blotting	8 – 10	8
2/2	Transposon display/Southern blotting	3	4
2/3	Transposon display/Southern blotting	10 – 12	10
2/9	Transposon display/Southern blotting	1	1
1	Transposon display/Southern blotting	12 – 13	13
4	Dot blot	52	50
5	Transposon display/Southern blotting	15	15
6	Transposon display/Southern blotting	12	11
7	Transposon display/Southern blotting	1	1
8	Transposon display/Southern blotting	2	2
9	Transposon display/Southern blotting	1	1
A3	Splinkerette PCR/Inverse PCR	2	2
A4	Splinkerette PCR/Inverse PCR	4	4
A5	Splinkerette PCR/Inverse PCR	4	4,5
A6	Splinkerette PCR/Inverse PCR	2	2
B1	Splinkerette PCR/Inverse PCR	1	2
B2	Splinkerette PCR/Inverse PCR	2	2
B3	Splinkerette PCR/Inverse PCR	3	3
B5	Splinkerette PCR/Inverse PCR	2	2
C3	Splinkerette PCR/Inverse PCR	1	2
C5	Splinkerette PCR/Inverse PCR	2	2
3	Splinkerette PCR/Inverse PCR	1	1
16	Splinkerette PCR/Inverse PCR	1	1
3.a	Splinkerette PCR/Inverse PCR	1	1
6.a	Splinkerette PCR/Inverse PCR	1	1
12.a	Splinkerette PCR/Inverse PCR	1	1

2. táblázat. A transzgen független qPCR (IRDR-L) validálása ismert kópiaszámú SB tartalmú klónokon.

5.2.2. Transzpozon donor kivágódásának (*excízió*) mérése

A génterápiás alkalmazásokban a génbeviteli rendszer hatékonysága szempontjából a végeredmény monitorozását tartják elsődlegesnek, melyet a transzgenikussá váló sejtek mérésével jellemeznek (transzgenikus hatékonyság). A transzgen funkciója alapján végzett mérés azonban időigényes, nem minden esetben kivitelezhető, és egyedül a végeredményt jellemzi, melyet a transzpozáz által kifejtett aktivitáson kívül más tényezők is befolyásolhatnak. A transzpozáz közvetlen aktivitását mind az *in vitro*, mind az *in vivo* vizsgálatokban, sok esetben a donor helyről történő kivágódással tesztelik. Erre számos lehetőség van, nekünk elsősorban a génterápiát modellező rendszerben mutatott aktivitás közvetlen, gyors és összehasonlítható monitorozása volt a célunk, ezért a transzpozon donor plazmidból történő kivágódásának qPCR alapú mérését

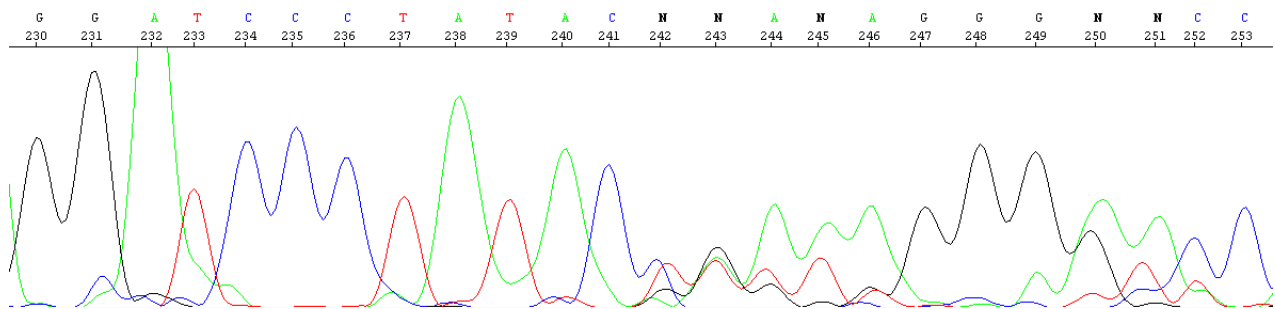
választottuk. A kétkomponenses rendszerrel transzfektált sejtekből 48 óra elteltével plazmidot tisztítottunk a kivágási PCR elvégzésére. A módszer működésének alapja, hogy a transzpozont határoló plazmid DNS-re tervezett primerek felhasználásával kizárólag kivágást és javítást követően kapunk megfelelő méretben PCR terméket (**22. ábra**). Az eredeti donor plazmidról a transzpozon nagy mérete miatt (min. 2-3 kb) nem keletkezik a rövid extenziós idő alatt PCR termék.



22. ábra. Kivágódások detektálása egymásba ágyazott (*nested*) PCR-el.

Részletes magyarázat a szövegben található.

TaqMan próba alkalmazásának akkor lenne jelentősebb előnye, ha a próbát kimondottan a két összeillesztett donor DNS végre terveznénk, mivel ez a szekvencia kizárólag a kivágott és javítással recirkularizált plazmidon van jelen. A sejtben ilyenkor többségében végbemenő NHEJ javítás azonban nem elhanyagolható mértékben hibákat (inzerció/delécio) eredményez, melyet az SB-vel végzett génbevitel exciziós PCR termék szekvenálásával magunk is teszteltünk (**23. ábra**). A kanonikus javítás eredményeként a TA TSD-k között elhelyezkedő transzpozonból CAG/CTG *footprint* marad vissza: TACAGTA. Ebből a szekvenciából a bemutatott példa esetén a határoló plazmid szekvencia után a TAC látszik biztosan. Ezt követően többféle szekvencia detektálható (**23. ábra**), ami azt jelenti, hogy a kanonikus *footprint*-en kívül néhány nukleotidos delécio vagy inzerció is jelentős számban előfordulnak.

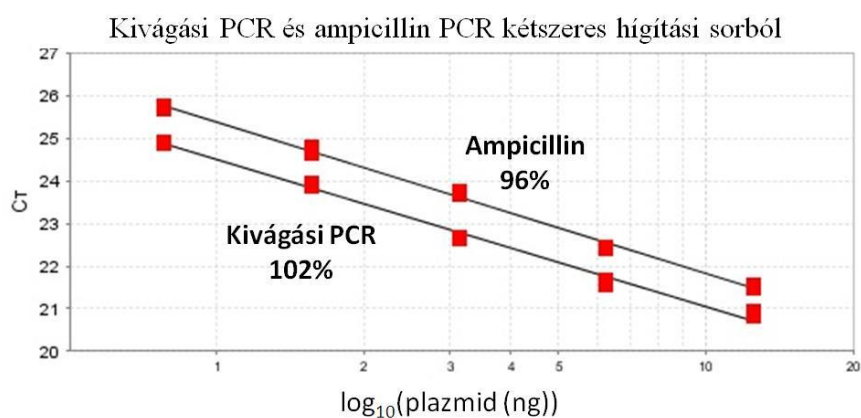


23. ábra. SB transzpozon donor kivágódásait detektáló PCR termék szekvenálása.

A transzpozon donor plazmidból történő kivágását követően a sejt NHEJ javító rendszere összeilleszti a határoló plazmid szekvenciákat. Az erről amplifikált PCR termék a javító rendszer hibáinak köszönhetően heterogén szekvenciát mutat az illesztés helyén.

A fent leírtak alapján a transzpozon kivágás kvantifikálásához a TaqMan próba helyett inkább a PCR termék méretével (382 bp) biztosítottuk a specifitást, és *SYBR green* kémiát használva meghatározott olvadásponttal rendelkező terméket tekintettünk excíziós terméknek, melyet minden esetben jól működő pozitív kontroll mintából származó qPCR mellett mértünk. A termék méreteket agaróz gélelektroforézissel is ellenőriztük. Az excíziós qPCR-t a donor plazmidon jelen lévő ampicillin szekvenciáról amplifikált hasonló méretű (340 bp) termék mennyiségére normalizáltuk, így a kivágáson átesett plazmidok mennyiségét a sejtbe bejutó donor plazmid mennyiségére vonatkoztattuk. Mivel a *helper* plazmid nem ampicillin rezisztenciát hordoz, a *helper* mennyiségének esetleges változtatása – például a túltermeléses gátlás tanulmányozásánál – nem befolyásolta a normalizálást és így az összehasonlíthatóságot. Mivel a sejtekbe bejutott donor plazmidnak sok esetben csak nagyon kis hányadán történik kivágás, egyetlen PCR-ben túl sok ciklust kellene alkalmazni, ami már nem kívánt melléktermékeket eredményezhet. A specifitás növelése érdekében egymásba ágyazott (*nested*) PCR alkalmazására van szükség. A qPCR-t megelőzően a kivágott plazmidokról normál PCR-el előamplifikálást végeztünk külső *nested* primerpár segítségével (**22. ábra, 1. kör**), melynek ciklusszámát és a PCR-t követő hígítást úgy állítottuk be, hogy a második qPCR körben (**22. ábra, 2. kör**) az excíziós termék Ct értéke a normalizálására használt ampicillin Ct értékét megközelítse. Az ampicillin qPCR-t ugyanabból a hígított első körös kivágási PCR-ből mértünk be. A nagyon eltérő génbeviteli hatékonyságú kísérleti rendszerek összehasonlításánál az előamplifikálás külön optimalizálást igényelt (10-25 ciklus). A két külön primerpárral megvalósított kivágási kvantifikálás hatékonyságát együttesen határoztuk meg oly módon, hogy a transzfektált sejtekből tisztított plazmidból készítettünk hígítási sort, és ezeket használtuk az első PCR kör bemérésre.

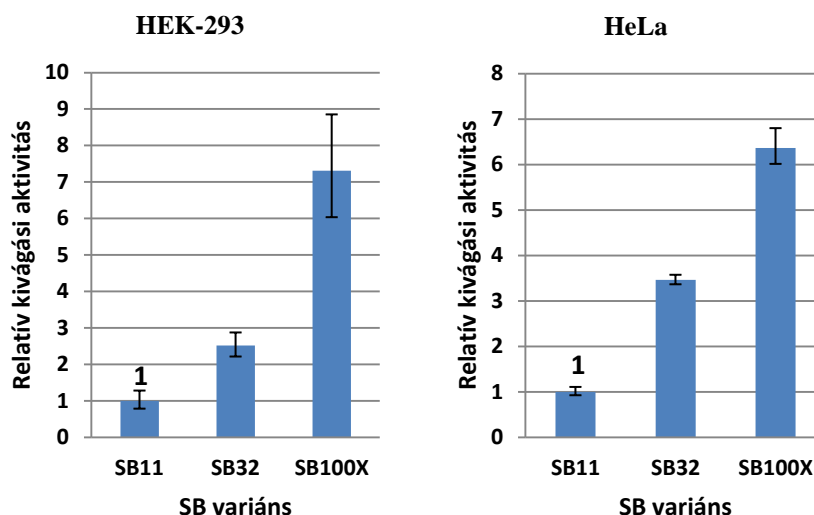
Az így kapott PCR hatékonyságok mind a kétkörös kivágási qPCR-re, mind az ampicillinre összemérhetően jónak bizonyultak (24. ábra).



24. ábra. Kvantitatív kivágási PCR hatékonyságának meghatározása (SYBR green kémiával).

Részletes magyarázat a szövegben található.

Az így beállított kvantitatív kivágási PCR-ünket a különböző aktivitású SB variánsok génbevitelben mutatott kivágási aktivitásának összehasonlításával validáltuk. Ugyanolyan génbeviteli kondíciók alkalmazása mellett két különböző sejttípuson (HEK-293 és HeLa) hasonló kivágási aktivitás különbségeket kaptunk a különböző SB variánsok között (25. ábra).



25. ábra. SB variánsok relatív kivágási aktivitásának mérése qPCR-el.

A kivágási PCR-t ampicillinre normalizáltuk, és a $\Delta\Delta C_t$ módszer alkalmazásával az SB11-el végzett kotranszfekciót vettük referenciaként. Púlozott biológiai párhuzamosok reprezentatív mérései. Az értékek három párhuzamos mérés átlagát mutatják, a hibásávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

5.3. SB integrációs helyek meghatározása és karakterizálása

A génbevitel során a transzpozíció működésének tesztelésére szolgál az inaktív kontroll transzfecció, melyben nem adunk transzpozáz a transzfeccióhoz, vagy katalitikusan mutáns transzpozáz expresszázó vektorral kotranszfecciót. A transzpozáz aktivitás eredményeként az aktív transzpozícióban a transzfecciót követő hetekben a sejtpopulációban magasabb transzgen expressziót kapunk az inaktív kontrollhoz képest (**15. ábra**). A transzpozíció tesztelésének másik módja a kivágási PCR termék amplifikációja, mely kvantifikálásra is ad lehetőséget. Harmadik bizonyíték az integrálódott transzpozon genomiális helyének meghatározása. Az SB transzpozon karakterizálásának részeként szűrőpróba szerűen meghatároztunk néhány integrációs helyet splinkerette PCR módszerrel (**3. táblázat**). Ennek célja egyrészt az volt, hogy validáljuk a transzpozáz mediált integrációt. Másrészt a progenitor sejteken, illetve őssejteken való biztonságos alkalmazás feltétele az integrációs hely azonosítása, így például az SB rendszerrel létrehozott iPS klónok esetén is meghatároztunk integrációs helyeket [261].

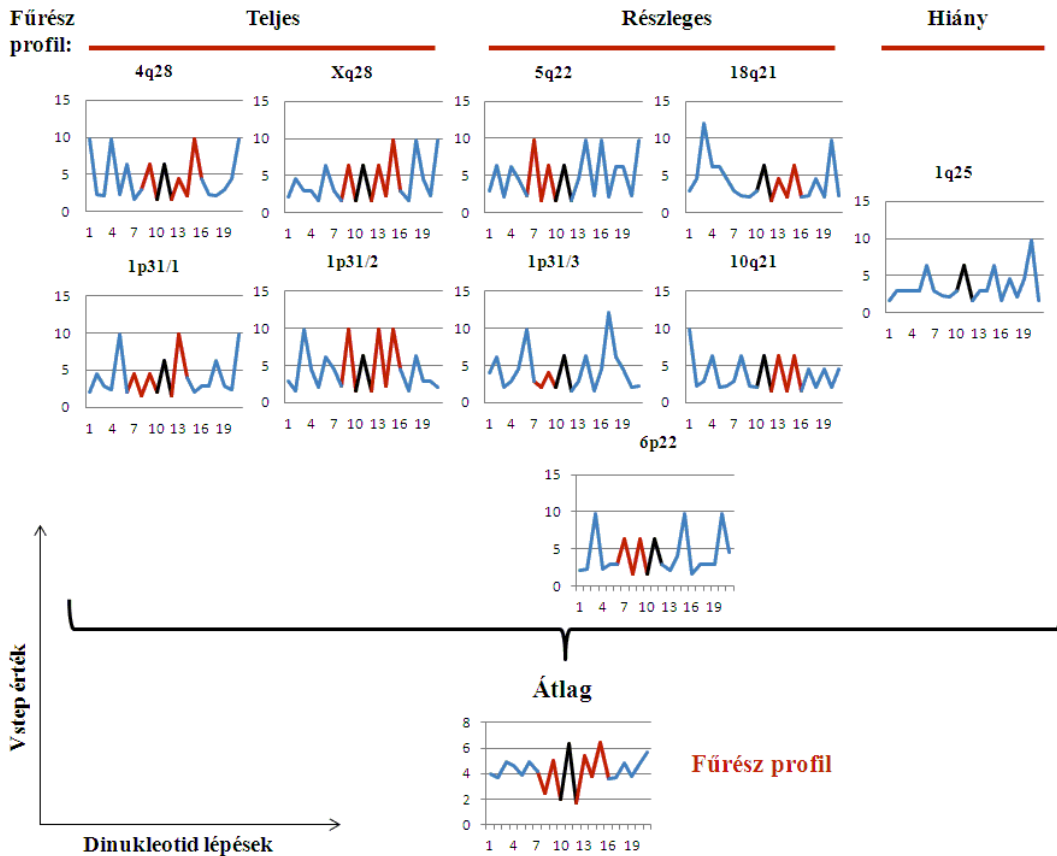
Klón	Kópia-szám (qPCR)	Szekvencia	Lokalizáció	Referencia szekvencia	Nukleotid pozíció	Régió típusa	Orientáció	
3	1	TTCTCCCTGGACTTTAGGACATA TAcagttgaagt	Hs 5q22	NT_034772.6	6866220	Inter-genikus	Bal	
		AGGAAGTATACACTCACCTGTGA TAcagttgaagt	Hs 5q22	NT_034772.6	6866220		Jobb	
7	1	TGTGAACCTAGGAATTTTAACT TAcagttgaagt	Hs 1q25	NT_004487.19	37342024	Inter-genikus	B	
16	1	GACACAGCTGATTTTGAAGTCAGA TAcagttgaagt	Hs 4q28	NT_016354.19	65845752	SCOC intron1	B	
		GAAGACTACCCTATCACTGTATTA TAcagttgaagt	Hs 4q28	NT_016354.19	65845752		J	
3.a	1	TAGCACAATGAGTACTTTATCACA TAcagttgaagt	Hs 1p31	NT_032977.9	82218216	Inter-genikus	B	
6.a	1	AATACATGGAAGGTAGAACAGATC TAcagttgaagt	Hs 1p31	NT_032977.9	88638434	Inter-genikus	B	
		TAAATTATACATGTCTGTAAAGC TAcagttgaagt	Hs 1p31	NT_032977.9	88638434		J	
12.a	1	TCTGGAAAGCCACATTCGGGAAGT TAcagttgaagt	Hs 18q21	NT_025028.14	21860434	Inter-genikus	B	
C5	2	CAGTTTTATTATTATTGTCATTGTA TAcagttgaagt	Hs Xq28	NT_167198.1	2288320	GABRA3 intron3	B	
		CAGATCCTGATAAATGTTAGTTAC TAcagttgaagt	Hs 10q21	NT_030059.13	4645679		PRKG1 intron7	B
B3	3	CAGTTTTATTATTATTGTCATTGTA TAcagttgaagt	Hs Xq28	NT_167198.1	2288320	GABRA3 intron3	B	
		TGTTCAAGCTGTTTCAGCCTTCAAGC TAcagttgaagt	Hs 1p31	NT_032977.9	7121484		Inter-genikus	B
		TTCTTGTTACTCCTTCAAATGCT TAcagttgaagt	Hs 6p22	NT_007592.15	51406968		Inter-genikus	B

3. táblázat. SB integrációs helyek azonosítása.

Elmondhatjuk, hogy az aktív integráció eredményeként a transzpozon szekvenciát minden esetben genomi környezet határolta a kanonikus TA integrációs helyek részvételével. Az egykópiás klónok esetén 6 klónból 3 esetben a transzpozon mindkét oldaláról tudtuk azonosítani ugyanazt az integrációs helyet, a 2-, illetve 3 kópiás iPS klónok esetén is mindegyik integrációt azonosítottuk. A két iPS klón esetén az egyik integrációs hely teljesen azonos, amely felveti az azonos klonális eredet lehetőségét. Az összesen 10 különböző lokalizáció közül 7 esetben intergenikus régiót-, 3 esetben intronikus integrációt kaptunk, mely hozzávetőleg tükrözi a génrégiók arányát a genomban. Egyetlen esetben sem találtunk kódoló- vagy 5'UTR integrációs szekvenciát. Érdekes, hogy az integrációs helyek közül három különböző integráció ugyanazt a lókuszt érintette – 1p31 – egymás közelében. Az egyik ilyen helyet iPS-ben találtuk, a másik kettőt HEK-293 klónokban, ami kizárja az azonos eredetet.

Vizsgáltuk az integrációs helyek szekvenciális összetételét. Megnéztük az integrációk 100 nukleotidos környezetében a TA dinukleotidok denzitását, melyek átlaga magasabb volt, mint a genomra jellemző átlag. A különbség azonban a kapott integrációs helyek magas szórásának köszönhetően nem bizonyult szignifikánsnak. Számos DNS-sel interaktáló fehérje nem mutat szekvenciális preferenciát, mégis a kötött DNS szekvenciák fehérje indukálta deformálhatósága, illetve strukturális felépítése esetenként jellegzetességeket tükröz. Ezért vizsgáltuk az SB integrációk egy DNS deformálhatósági paramétere a Vstep érték által kirajzolt görbéit 22 nukleotidos környezetben (**26. ábra**). A Vstep az egyes dinukleotid lépéseket jellemzi, melyeknek értékét empirikusan határozták meg számos fehérje-DNS interakció átlagát véve alapul [262].

Ha a TA integrációs helyek környezetének Vstep görbéit átlagoltuk, karakterisztikus fűrészhez hasonlítható profilt kapunk (**26. ábra, Átlag görbe**). Ez valószínűsíti, hogy a TA tuskét közvetlenül határoló további tuskék fontosak lehetnek az integrációs lépésben. Az egyes profilok három csoportra oszthatók a karakter alapján. Teljes fűrész profil esetén a TA túske mindkét oldalán-, részleges esetben csak az egyik oldalon látható túske, illetve teljesen hiányozhat. Az általunk meghatározott integrációk karaktereinek eloszlását a genomban előforduló TA helyek eloszlásával hasonlítottuk össze, melyhez az adatok az irodalomból származnak [263]. Az SB integrációk eloszlása szignifikánsan különbözött a genomiálistól (**4. táblázat**). A genomban előforduló legtöbb TA hely Vstep görbéje egyáltalán nem mutat fűrész profilt, ezzel szemben a 10 integrációból csak egy esetben kaptunk ilyen görbét. A teljes fűrész profilt mutató integrációk pedig 3,64-szeres preferenciát mutattak, ami 20-szorosnak bizonyult az indifferens profilhoz képest.



26. ábra. SB integrációk TA környezetének Vstep görbéi.

A Vstep értékekkel azt a térfogatot jellemzik, amelyen belül az adott dinukleotid lépésben a két nukleotid egymáshoz képest elmozdulhat, miközben a kettős hélix tengelye deformálódik. Feketével jelöltük a TA dinukleotid lépés magas- és az azt határoló alacsony Vstep értékek által kirajzolt tuskét. Ezt a karakterisztikus tuskét szegélyező további tuskékat pirossal jelöltük.

TA helyek fűrész profilja	Genomiális előfordulás (%) (Geurts, NAR, 2006)	SB integrációk (db)	Genomiális preferencia (%/%)	Relatív preferencia
Teljes	11	4	3,64x	20x
Részleges	32	5	1,56x	9x
Hiány	56	1	0,18x	1x

p<0,003 (Fisher-egzakt teszt)

4. táblázat. TA helyek Vstep görbe profiljainak eloszlása és az SB integrációk preferenciája.

Részletes magyarázat a szövegben található.

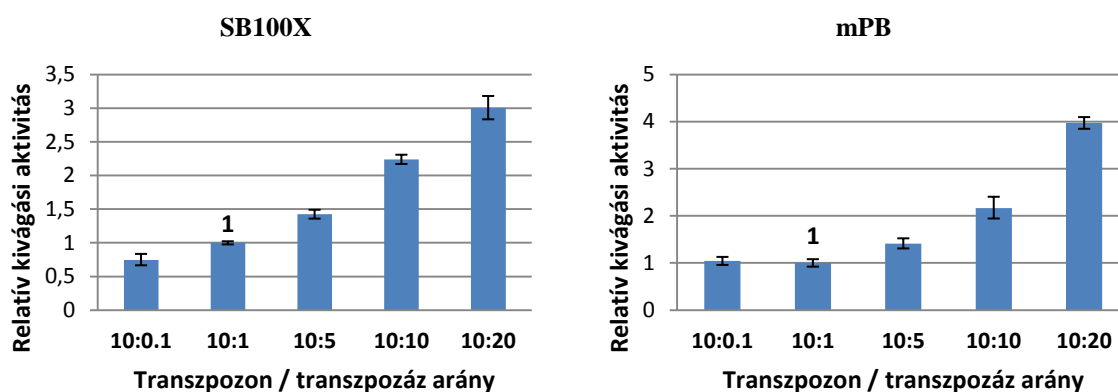
5.4. Túltermeléses gátlás jelenségének vizsgálata és a génbevitel optimalizálása különböző sejteken a két leghatékonyabb rendszert illetően (SB és PB DNS transzpozonos rendszerek)

A DNS transzpozon alapú génbeviteli rendszerek irodalomban leírt alkalmazásai az egyes applikációk eltérései miatt kevésbé összehasonlíthatók. Célunk az volt, hogy néhány gyakori sejtípuson „egymás mellett” teszteljük a két leghatékonyabb rendszert, miközben a génbevitel több aspektusát vizsgáljuk. A „cut and paste” transzpozíció mechanizmusát tekintve két jól definiált egymást követő lépésre osztható: kivágás a donor helyről és integráció a célszekvenciába, például a genomba. Ezeket a lépéseket szeparáltan vizsgáltuk, és a transzpozíciós aktivitást három szinten jellemeztük. Meghatároztuk a transzpozon kivágódásának mértékét a donor helyről, mértük a transzgenikussá vált sejtek számát, valamint kvantifikáltuk azok átlagos kópiaszámát. Ezekben az összehasonlító kísérletekben endogén promotert alkalmaztunk a transzgén expressziójának szabályozására, a foszfo-glicerát kináz gén promóterét (PGK). Puromycin rezisztenciát kódoló transzgént vittünk be a transzgenikussá váló sejtek monitorozására. Az SB és a PB transzpozon kazetták egyedül a specifikus transzpozon szekvenciákban különböztek, melyet az SB IRDR-ek PB ITR-eire történő cseréjével értünk el. Ennek köszönhetően a kivágási qPCR mind a két rendszernél alkalmazható volt.

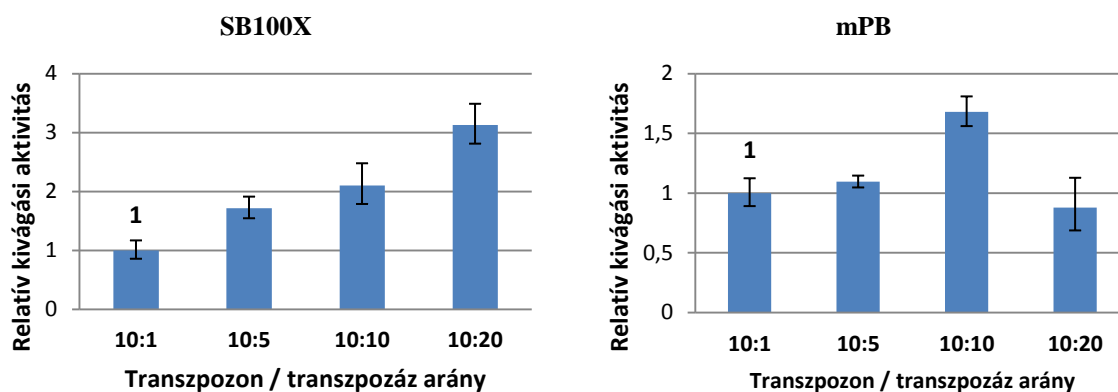
5.4.1. Transzpozáz aktivitás jellemzése a kivágás kvantifikálásával

Mivel a donor helyről történő kivágódás közvetlenül jellemzi a transzpozáz aktivitást, ezért ennek mérése alkalmas arra, hogy külön vizsgáljuk és a kivágási hatékonyságokkal jellemezzük, illetve összehasonlítsuk a különböző rendszereket. Jóllehet a kivágási- és transzgenikus hatékonyságokat külön ismertetjük, az egyes összehasonlítások ugyanazon transzfekeciós kísérletsorból származnak. A génbevitel optimalizálásának részeként, elsőként a túltermeléses gátlás jelentkezését teszteltük. Lipid alapú transzfekecióban emelkedő dózisban transzfekektáltuk az SB100X és mPB *helper* plazmidokat, melyekben CMV promóter biztosította a transzpozáz expressziót. A transzpozon donor mennyiségét konstans értéken tartottuk, és az összes DNS mennyiséget indifferens plazmiddal egészítettük ki azonos mennyiségre. HEK-293 sejten mind az SB100X, mind az mPB kivágási aktivitása stabil emelkedést mutatott egészen a tesztelés végpontjáig, 10:20 transzpozon / transzpozáz arányig (**27A. ábra**). Ugyanezt tapasztaltuk az SB100X esetén HeLa sejten, míg az mPB egy adott dózis felett alacsonyabb kivágási hatékonyságot mutatott ezen a sejten a gátlás jelentkezésének jeleként (**27B. ábra**).

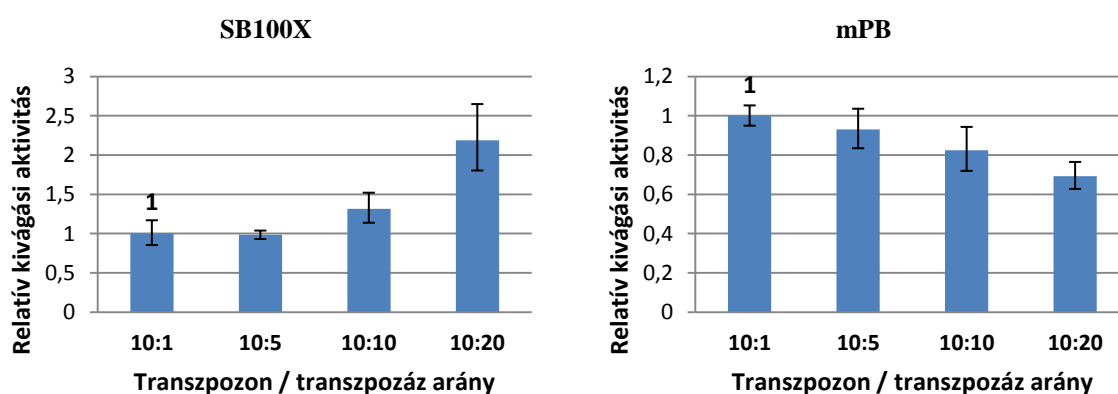
A HEK-293



B HeLa



C HEK-293, Nukleofekció

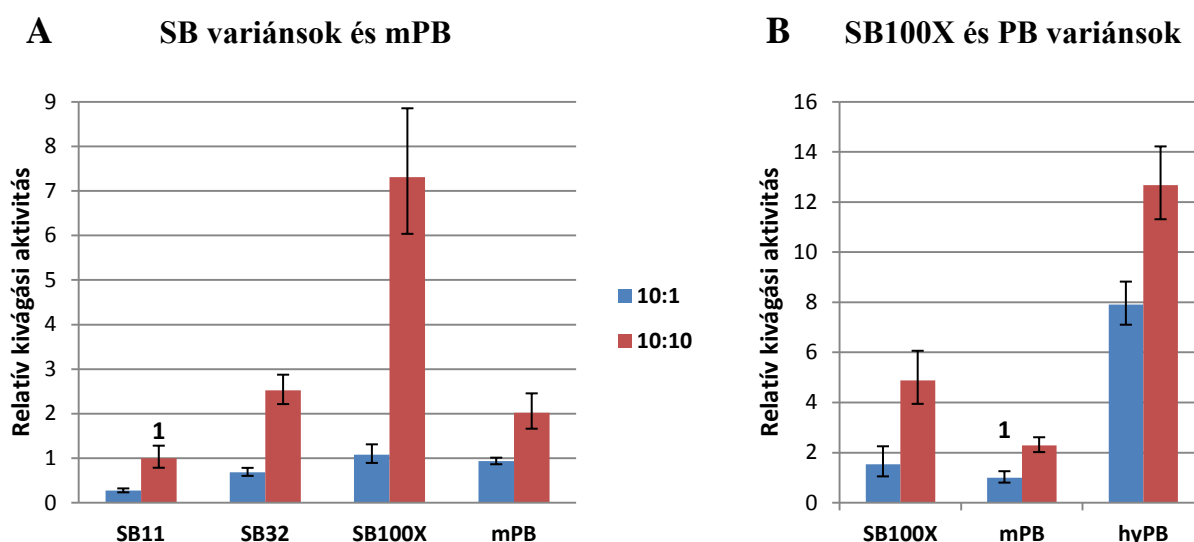


27. ábra. A transzpozáz dózis hatása a kivágási aktivitásra HEK-293 és HeLa sejteken.

SB100X és mPB rendszerek transzpozon kivágódásának relatív kvantifikálása qPCR-el a transzpozáz dózisának függvényében konstans transzpozon dózis mellett. (A, B) Dózisfüggés lipid alapú transzfekcióval HEK-293 és HeLa sejteken. (C) Dózisfüggés nukleofekcióval HEK-293 sejten. Púlozott biológiai párhuzamosok reprezentatív mérései. Az értékek három párhuzamos mérés átlagát mutatják, a hibásávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

A magasabb transzpozáz expresszió elérése érdekében növeltük a transzfekeció hatékonyságát és nukleofekciót alkalmaztunk, mely növeli a transzgenikus hatékonyságot [264]. Ezzel a módszerrel az mPB HEK-293 sejteken is mutatta a gátlást a kivágási aktivitás állandó csökkenésével, ezzel szemben az SB100X kivágási aktivitása ugyanabban a dózistartományban nem csökkent (**27C. ábra**).

Vizsgáltunk más kevésbé aktív SB variánst a kivágás szintjén HEK-293 sejten, az SB11-et és az SB32-t. Egyik sem mutatott gátlást, amikor a transzpozáz dózist 10:1-ről 10:10-re emeltük (**28A. ábra**). Ebben az összehasonlításban az mPB kivágási aktivitása 10:10 aránynál reprodukálhatóan alacsonyabbnak mutatkozott a hiperaktív SB100X-hoz képest. A kivágás tesztelését a legaktívabb PB variánssra (hyPB) is elvégeztük (**28B. ábra**). A kielégítő transzfekeciós hatékonyságot biztosító lipid alapú transzfekeció a hyPB esetén sem eredményezett gátlást 10:10 aránynál a 10:1 arányhoz képest, és a hyPB kivágási aktivitása az SB100X variánsét mindkét dóziskombinációban jelentősen meghaladta.



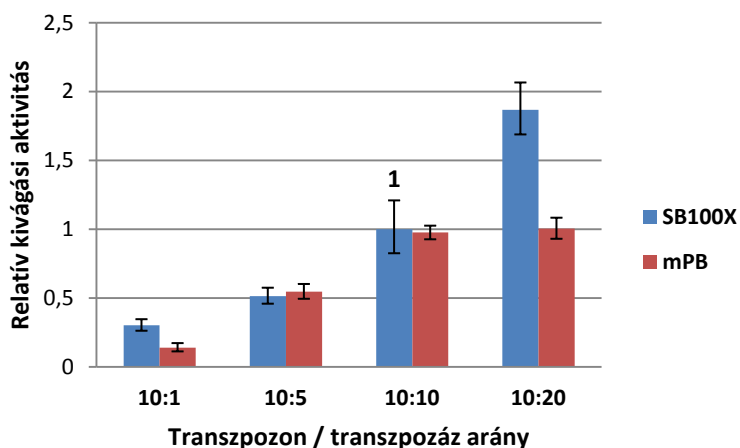
28. ábra. SB- és PB variánsok kivágási aktivitásának összehasonlítása HEK-293 sejten.

A transzpozon donor kivágódásának relatív kvantifikálása qPCR-el a transzpozáz dózisének függvényében. **(A)** SB variánsok és az mPB összehasonlítása. **(B)** SB100X és a PB variánsok összehasonlítása. Púlozott biológiai párhuzamosok reprezentatív mérései. Az értékek három párhuzamos mérés átlagát mutatják, a hibásávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

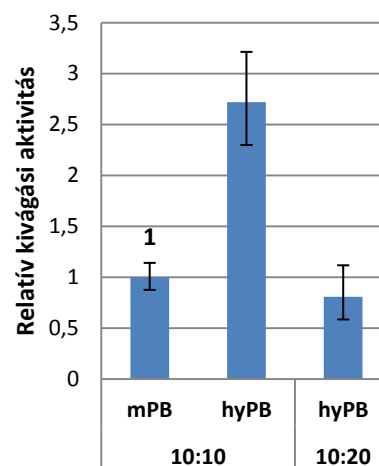
Vizsgáltuk a kivágási aktivitásokat HUES9 humán embrionális őssejtvonalon, melyet nehezen transzfekektálható sejtípus lévén nukleofekcióval transzfekektáltunk. Az SB100X és az mPB rendszerek kivágási aktivitása ezen a sejten több transzpozáz dózisban is összemérhetőnek bizonyult (**29A. ábra**). A transzpozáz dózis növelésével a korábbiakhoz hasonlóan az SB100X

kivágási aktivitásának konstans emelkedése figyelhető meg, ám az mPB esetén a legnagyobb dózis (10:20) már telítést mutatott (**29A. ábra**). A hyPB-re HUES9 sejten is jelentősen magasabb kivágási aktivitást kaptunk az mPB-hez képest, és a legnagyobb dózis már jelentősebb gátlást mutatott (**29B. ábra**).

A SB100X és mPB transzpozáz dózisfüggése



B mPB és hyPB



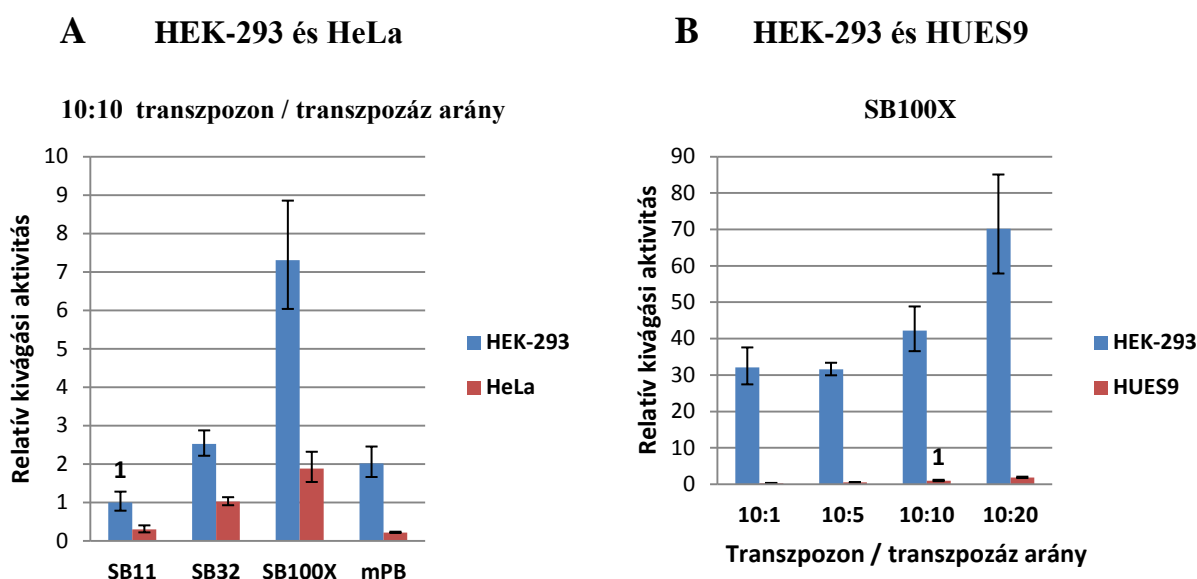
29. ábra. Kivágási aktivitások vizsgálata HUES9 sejten.

A transzpozon donor kivágódásának relatív kvantifikálása qPCR-el a transzpozáz dózisának függvényében. **(A)** SB100X és mPB dózisfüggése és összehasonlítása. **(B)** mPB és hyPB összehasonlítása, valamint a hyPB dózisfüggése. Púlozott biológiai párhuzamosok reprezentatív mérései. Az értékek három párhuzamos mérés átlagát mutatják, a hibaszávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

Ugyanazon sejten, parallel módon végzett transzfekeciók hatékonyságai alacsony variabilitást mutattak (3-6%), különböző kísérletek, illetve sejtek esetén azonban lehetnek nagyobb eltérések (40% vs 60%). A sejtekbe bejutó donor plazmidra történő normalizálás függetlenné teszi a kvantitatív kivágási PCR-t a transzfekeciós hatékonyságtól, így a különböző sejtek is összehasonlíthatóvá válnak. Az alacsonyabb transzfekeciós hatékonyság alacsonyabb transzpozáz expressziót eredményez, ám arányosan a donor plazmid mennyisége is kevesebb a sejtekben. Ezért különböző sejtek összehasonlítását is elvégeztük a kivágási hatékonyság oldaláról. Lipid alapú transzfekeciót alkalmazva HEK-293 és HeLa sejteket parallel módon teszteltünk olyan dóziskombinációban, amely a PB esetén sem eredményezett gátlást. 10:10 transzpozon transzpozáz arány mellett minden tesztelt rendszer esetén a HEK-293 sejten magasabb kivágási aktivitás volt megfigyelhető (**30A. ábra**). Érdeemes megjegyezni, hogy az mPB kivágási aktivitása HEK-293 sejten az SB32 variánséhoz volt mérhető, míg HeLa sejten az aktivitása nem haladta meg az SB11-ét. Ugyanakkor HUES9 sejten az mPB kivágási aktivitása az

SB100X-éhoz volt hasonló (29A. ábra). HUES9 sejten tapasztalt kivágás egy nagyságrenddel alacsonyabbnak mutatkozott a HEK-293-hoz képest mind az SB100X- (30B. ábra), mind az mPB esetén. Ebben az összehasonlításban is ugyanazon transzpozon donorral és ugyanazon módszerrel, elektroporációval transzfektáltuk a két sejtet.

Összefoglalva a kivágási aktivitások tesztelését elmondhatjuk, hogy a HEK-293 sejt bizonyult a leginkább permisszívnek a transzpozon donor kivágása szempontjából. A gátlás kizárólag a PB rendszerek esetén volt megfigyelhető kis mértékben, mely kielégítő hatékonyságú transzfekeciós módszerek alkalmazása mellett kizárólag a transzpozon donort meghaladó transzpozáz dózisok esetén jelentkezett.



30. ábra. Különböző sejtekben mutatott kivágási aktivitások összehasonlítása.

A transzpozon donor kivágódásának relatív kvantifikálása qPCR-el a különböző sejtekben. (A) HEK-293 és HeLa sejtek összehasonlítása. (B) HEK-293 és HUES9 sejtek összehasonlítása. Púlozott biológiai párhuzamosok reprezentatív mérései. Az értékek három párhuzamos mérés átlagát mutatják, a hibásávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

5.4.2. Transzgenikus hatékonyság jellemzése

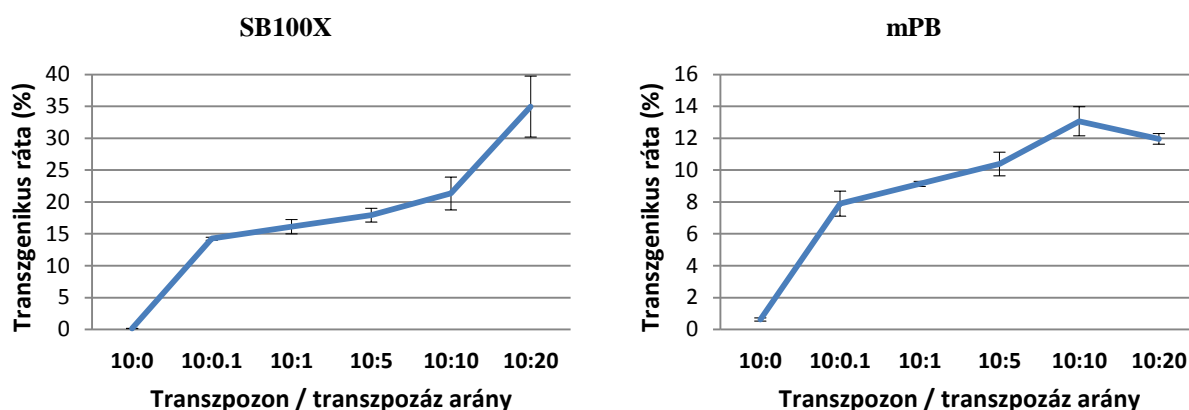
A transzgenikus hatékonyságok jellemzésére puromycin-nel történő szelekciót alkalmaztunk, melyhez megfelelő hígításban raktuk ki a sejteket a transzfekeciót követő második napon, így a két hét alatt képződött kolóniák száma arányos a transzgenikussá vált sejtek számával. A kolóniaesszében számolt klónokat a transzfekeciós hatékonyságra normalizáltuk, melyet GFP expreziós vektor kotranszfekeciójával kontrolláltunk és FACS-on mértünk. A kirakott sejtek számának ismeretében a transzfekeciált sejtek arányát figyelembe véve utóbbi százalékában

fejztük ki a transzgenikus sejtek számát (transzgenikus ráta). A transzpozáz dózisének emelésével HEK-293 sejten a kivágási aktivitásokhoz hasonlóan a transzgenikus rátában sem láttunk gátlást sem az SB100X, sem az mPB esetén (**31A. ábra**). HeLa sejten az SB100X transzgenikus rátája telítéshez hasonló görbét adott (**31B. ábra**), ami ellentétes az irodalmi adatokkal, ahol markáns gátlást tapasztaltak [217]. A kapott transzgenikus görbét némileg alátámasztja a kivágási aktivitás, ahol szintén nem volt tapasztalható gátlás, hanem konstans emelkedést láttunk (**27B. ábra**). A kivágásban mutatott emelkedéssel összehasonlítva a jelentősebb kivágási aktivitás azonban nem feltétlen eredményezett magasabb transzgenikus rátát, ahol inkább telítés látható. HeLa sejten az mPB esetén a transzgenikus rátában szintén detektálható volt a gátlás a legnagyobb transzpozáz dózisban (**31B. ábra**), ahogy a kivágási aktivitásban is jelentkezett (**27B. ábra**). Mivel az irodalmi adatok alapján az SB esetén a gátlás markánsabban jelentkezett alacsony transzpozon dózis mellett, mi is teszteltük ezt a kondíciót a gátlásra fogékonyabb HeLa sejten. Az eddig alkalmazott transzpozon dózis tizedét transzfektáltuk, és a transzpozáz dózis emelésével egyik SB variáns esetén sem kaptunk gátlást a transzgenikus rátában (**31C. ábra**). Az alacsonyabb aktivitású SB11 és SB32 variánsok esetén is inkább telítéshez hasonló görbét kaptunk.

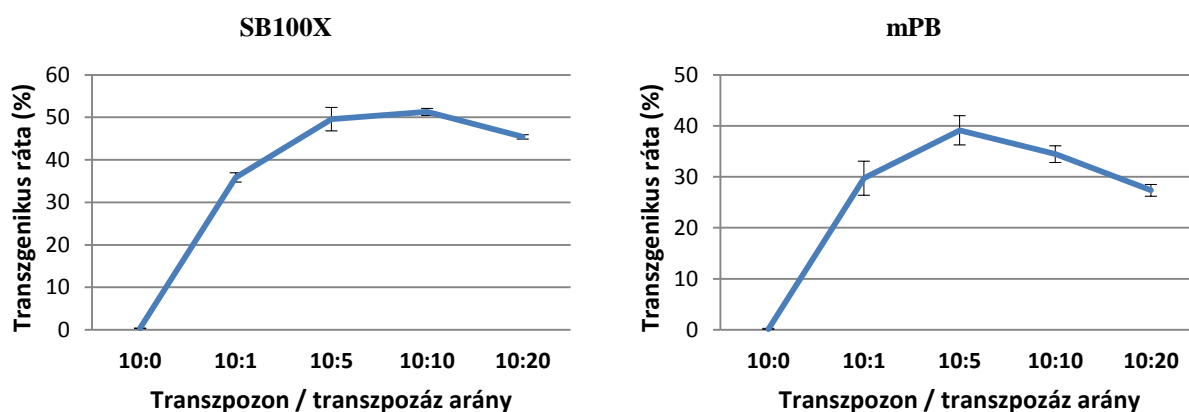
A kivágási aktivitáshoz hasonlóan a transzgenikus rátákat szintén összehasonlítottuk a két sejtípuson 10:10 transzpozon / transzpozáz arány mellett. HeLa sejten magasabb transzgenikus rátákat kaptunk a hiperaktív transzpozázokra mint HEK-293 sejten (**32A. ábra**). Mindez ellentétben áll azzal, hogy a kivágási aktivitások magasabbnak bizonyultak a HEK-293 sejten (**30A. ábra**). HeLa sejten a legmagasabb transzgenikus rátát az SB100X eredményezte, és a variánsok, valamint az mPB rátái a kivágási aktivitások tendenciáit többé-kevésbé tükrözték (**30A. ábra**). Érdekes módon HEK-293 sejten a kivágási tendenciák nem tükrözödték a transzgenikus rátában 10:10 arány esetén (**32A. ábra**).

Mivel az SB32 transzgenikus rátája jobbnak bizonyult, mint az SB100X-é, ezért többféle dóziskombinációban összehasonlítottuk a transzgenikus rátákat HEK-293 sejten. 10:1 arány esetén ugyanolyan tendenciát kaptunk, mint 10:10 aránynál (**32B. ábra**), tehát az SB32 hatékonyabb volt a transzgenikus rátában, mint az SB100X. Ezzel szemben az alacsony transzpozon dózisú 1:10 aránynál kapott transzgenikus ráták jól korreláltak a transzpozázok kivágási aktivitásaival (**32B. ábra**). Ebben az összehasonlításban az is látszik, hogy a magas transzpozon dózis mellett a transzpozáz dózis emelésének eredményeként jelentkező jelentős kivágási aktivitásnövekedés csak kevésbé emeli a transzgenikus rátát, mely az összes rendszer esetén megfigyelhető (**28A. és 32B. ábra, 10:1 és 10:10**).

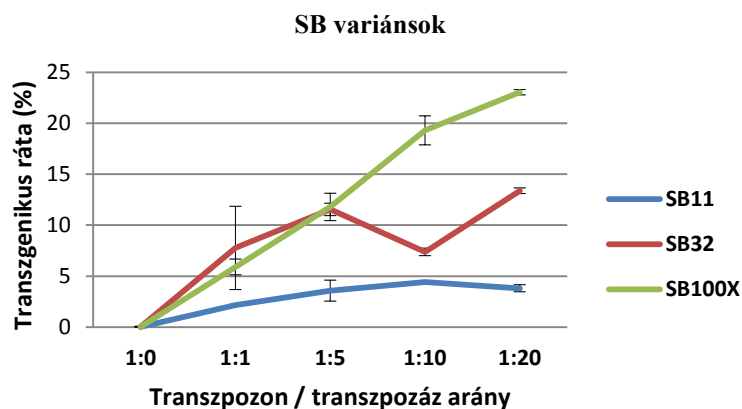
A HEK-293



B HeLa



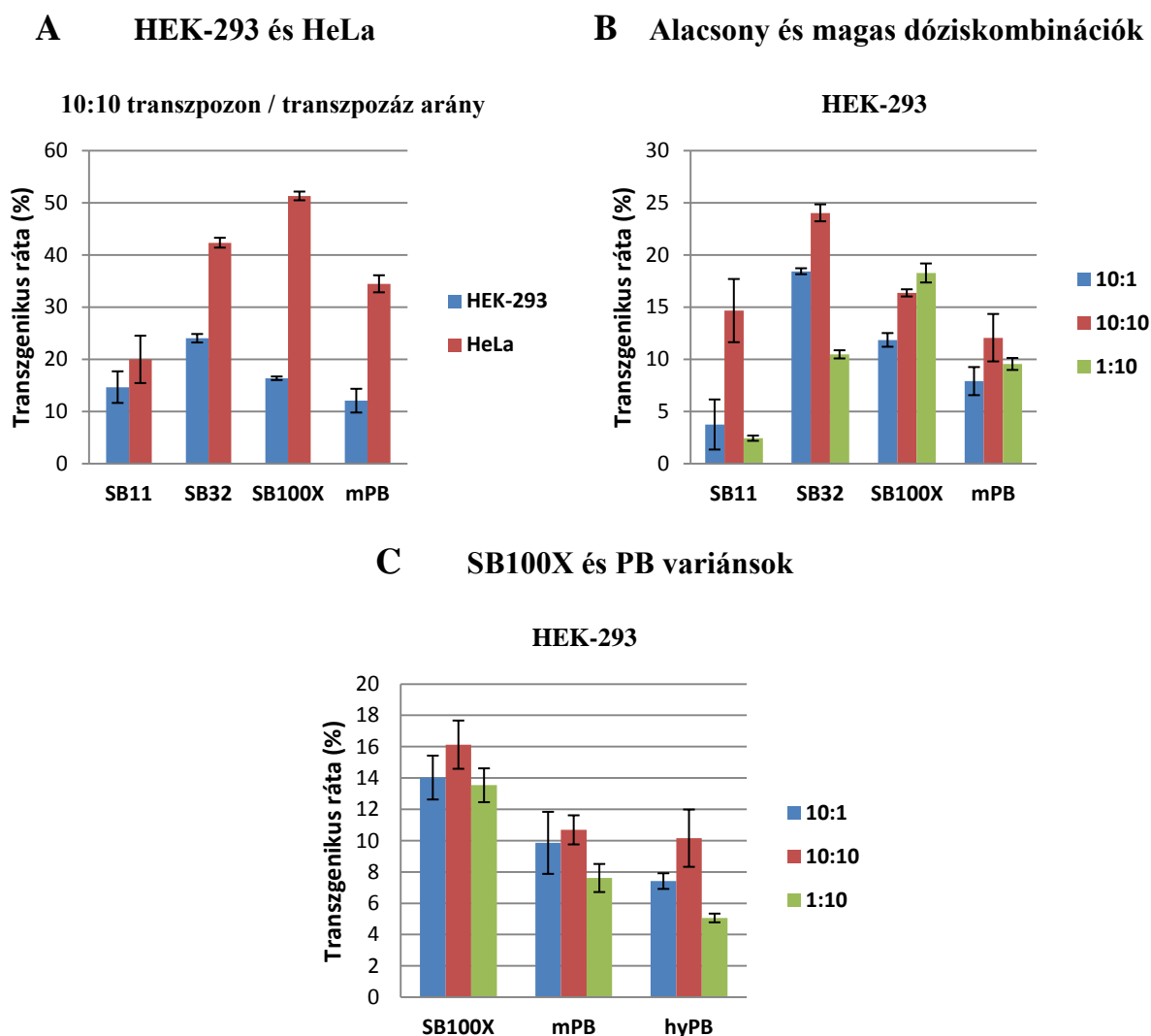
C HeLa, alacsony transzpozon dózis



31. ábra. Transzgenikus ráta transzpozáz dóziszfüggése HEK-293 és HeLa sejteken.

SB és mPB rendszerek puromycines transzpozonnal végzett génbevitelének kolóniaesszéje a transzpozáz dózisének függvényében konstans transzpozon dózis mellett. (A, B) Magas transzpozon dózis mellett HEK-293 és HeLa sejteken. (C) Alacsony transzpozon dózis mellett HeLa sejten. Parallel transzfekciók méréseinek átlagát ábrázoltuk, a hibásávok egyszeres szórását jelölnék.

Az egyetlen kivétel az SB11, ahol a 10:1 és 10:10 transzgenikus ráták jól tükrözik a kivágási aktivitásokat (**32B. ábra**). Az ő esetében a magas dóziskombináció jó transzfekciós hatékonyság mellett a többi transzpozázzal összemérhető transzgenikus hatásfokkal bír. A legaktívabb PB variánst szintén teszteltük a transzgenikus ráta oldaláról. Annak ellenére, hogy a hyPB a legmagasabb kivágási aktivitást mutatta HEK-293 sejtkben a többi rendszerhez képest (**28B. ábra**), transzgenikus rátája nem haladta meg az mPB hatékonyságát (**32C. ábra**).



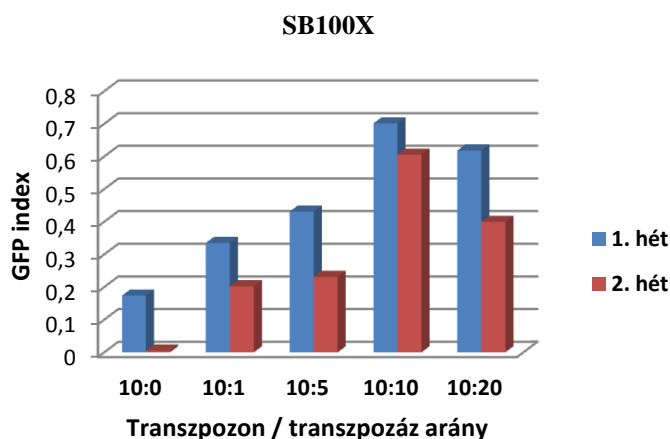
32. ábra. SB- és PB variánsok transzgenikus rátáinak összehasonlítása HEK-293 és HeLa sejteken.

SB és PB rendszerek puromycin-es transzpozonnal végzett génbevitelének kolóniaesszéje többféle dóziskombinációban. **(A)** Transzgenikus ráták összehasonlítása HEK-293 és HeLa sejteken konstans dóziskombinációban. **(B)** SB variánsok és mPB összehasonlítása HEK-293 sejten **(C)** SB100X és PB variánsok összehasonlítása HEK-293 sejten. Parallel transzfekciók méréseinek átlagát ábrázoltuk, a hibásávok egyszeres szórását jelölnék.

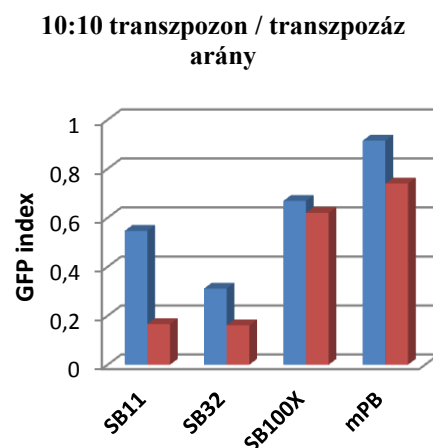
Több sejtes faktorról leírták, hogy interaktál az SB-vel és emeli a transzpozon aktivitást [90, 265]. Génkiütött sejteket kiegészítve a hiányzó faktorial jelentősen emelték a transzgenikus sejtek számát. Vizsgáltuk, hogy ezen faktorok expressziós különbségei vajon hozzájárulhatnak-e a HEK-293 és HeLa sejtekben tapasztalt kivágási és transzgenikus aktivitási eltérésekhez. Mindkét sejtben megmértük a HMGB1-, illetve az NHEJ rendszerhez tartozó DNAPKcs-, Ku70-, és Ku80 expressziós szinteket qRT-PCR-el. Ezek expressziója nem különbözött szignifikánsan a HEK-293 és HeLa sejtekben. Vizsgáltuk továbbá, hogy a transzpozonos rendszer transzfekciója indukálja-e a faktorok magasabb expresszióját ezekben a sejtekben, amelyre szintén nemleges választ kaptunk.

A harmadik általunk vizsgált sejt típuson, az embrionális őssejteken is elvégeztük a transzgenikus hatékonyságok vizsgálatát. Mivel a kolóniaesszé a HUES9 esetén nem kivitelezhető, GFP-t expresszáló transzpozonnal teszteltük mind a kivágási aktivitást, mind a transzgenikus hatékonyságot. Ebben az esetben is kizárólag a transzpozon ITR-ek különböztek a donor konstrukciókban az SB és PB rendszerek összehasonlításainál. Transzgenikus tesztrendszerünk alapja a GFP-t expresszáló sejtek aránya volt, melyet megmértünk FACS-on a transzfekciót követő második napon, valamint az azt követő 1 hét, illetve 2 hét elteltével. Az utolsó időpontban végzett mérés már a transzgenikussá vált sejtek mennyiségét jellemzi. Az 1-, illetve 2-hetes GFP%-ot normalizáltuk a transzfektált sejtek kezdeti arányával, melyet GFP indexként ábrázoltunk. A GFP index arányos mennyiség a transzgenikus rátával. Az SB100X dóziszfüggését tesztelve a legnagyobb transzpozáz dózis már alacsonyabb GFP indexet mutatott 10:20 aránynál, és a 10:10-nél alacsonyabb transzpozáz dózisok jóval gyengébb génbevitelt eredményeztek (**33A. ábra**). Ebben az esetben is elmondhatjuk, hogy a magasabb kivágási aktivitásból nem következett magasabb transzgenikus hatékonyság (**29A. és 33A. ábra**), sőt valamiféle gátlás sem kizárható, amely elsősorban az integrációs lépésben érvényesül. Az mPB GFP indexének dóziszfüggése korrelált a kivágási aktivitás tendenciájával, a 10:10 és 10:20 arányoknál telítés jellegű volt. Összehasonlítottuk HUES9 sejtben a transzgenikus hatékonyságokat a különböző rendszerekre szintén 10:10 dóziskombinációban, amelyben mindkét rendszer optimálisnak bizonyult. Elmondhatjuk, hogy az alacsonyabb kivágási aktivitású SB variánsok jelentősen gyengébb GFP indexet eredményeztek az SB100X-hoz képest, melynek mind a kivágási, mind a transzgenikus hatékonysága hasonlóan bizonyult az mPB-hez HUES9 sejtben (**33B. és C. ábra**). A hyPB pedig a magasabb kivágási aktivitásának megfelelően magasabb transzgenikus hatékonyságot eredményezett mind a két rendszerhez képest (**29B. és 33C. ábra**), bár a GFP indexben látott különbség nem volt annyira számottevő, mint a kivágási hatékonyságok esetén.

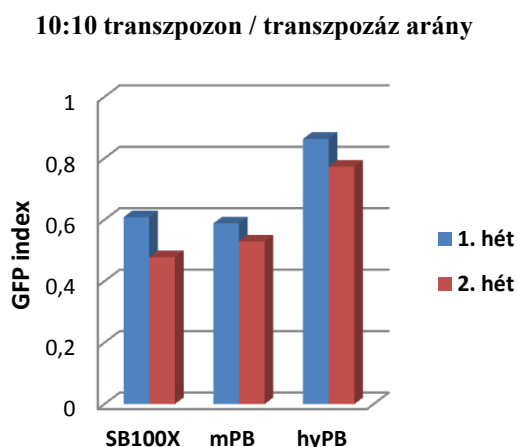
A SB100X dózisfüggése



B SB variánsok és mPB



C SB100X és PB variánsok



33. ábra. Transzgenikus hatékonyságok jellemzése HUES9 sejten.

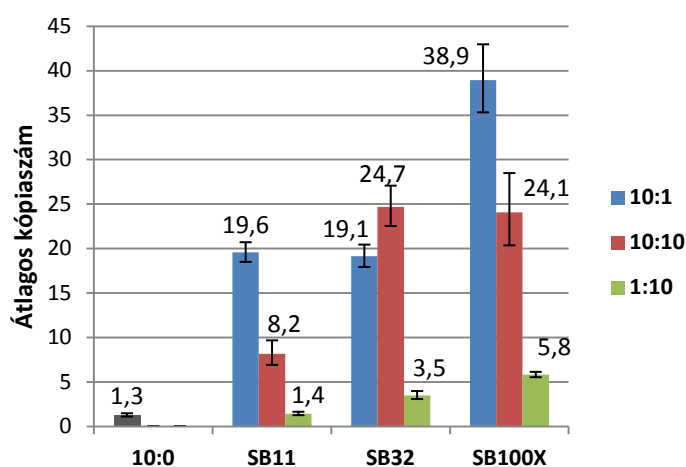
GFP index: a transzfectált sejtek azon hányada, melyek megtartották a transzgén expresszióját a GFP expresszáló transzpozonos rendszerek kotranszfectióját követő hetekben. A GFP-t expresszáló sejtek arányát FACS-on mértük. (A) SB100X dózisfüggése. (B) SB variánsok és mPB összehasonlítása konstans dóziskombinációban. (C) SB100X és PB variánsok összehasonlítása konstans dóziskombinációban. A diagramokon reprezentatív méréseket ábrázoltunk.

5.4.3. Transzpozonos génbeviteli kísérletek átlagos kópiaszámának jellemzése

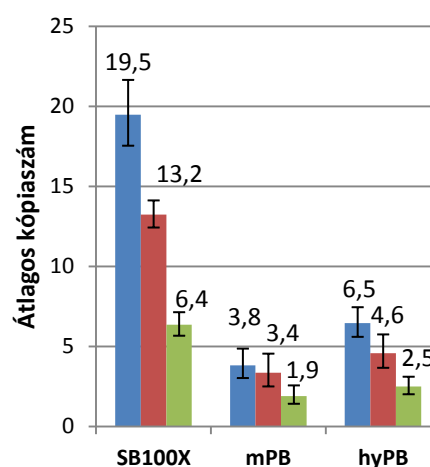
A génterápiás alkalmazások egyik feltétele, hogy a transzgén kópiaszámát jellemezzük, mely a transzgén expresszióját jelentősen befolyásolhatja. A kópiaszám a transzgenikus hatékonyság másik paramétereként is felfogható, mellyel az integrációs aktivitás jellemezhető. Az SB-PGK-puromycin transzpozonnal végzett előbbieken jellemzett génbevitel átlagos

kópiaszámát határoztuk meg HEK-293 sejtekben három hetes szelekciót követően, magas és alacsony transzpozon / transzpozáz dóziskombinációkban. Magas transzpozon dózis mellett valamennyi SB variáns meglepően magas átlagos kópiaszámot eredményezett (**34A. ábra**), még az SB11 is nyolc kópiát produkált a magas transzgenikus rátát eredményező 10:10 transzpozon / transzpozáz arány alkalmazásánál. Érdekes módon az SB11 és az SB100X variánsok esetén a transzpozáz dózisének 10:1-ről 10:10-re történő emelésével alacsonyabb átlagos kópiákat mértünk. A dózis emelése tehát jelentősen növelte a kivágási aktivitásokat (**28A. ábra**), a transzgenikus rátát azonban az SB11 kivételével nem emelte számottevően (**32B. ábra**), az átlagos kópiaszámot pedig két esetben csökkentette (**34A. ábra**). Jelentősen kevesebb kópiát mértünk az alacsony transzpozon dózissal transzfectált sejtekben (**34A. ábra**). Az SB variánsok 1:10 aránynál mért átlagos kópiái a transzgenikus rátáikhoz hasonlóan korreláltak a variánsok kivágási aktivitásaival (**32B. és 28A. ábra**). A jól transzfectálható sejtekben megnyilvánuló transzpozáz aktivitások tehát akkor korreláltak mind a három szinten, amikor a szubsztrátot limitáltuk és az enzimet maximáltuk.

A SB variánsok



B SB100X és PB variánsok



34. ábra. Átlagos kópiaszámok jellemzése HEK-293 sejten.

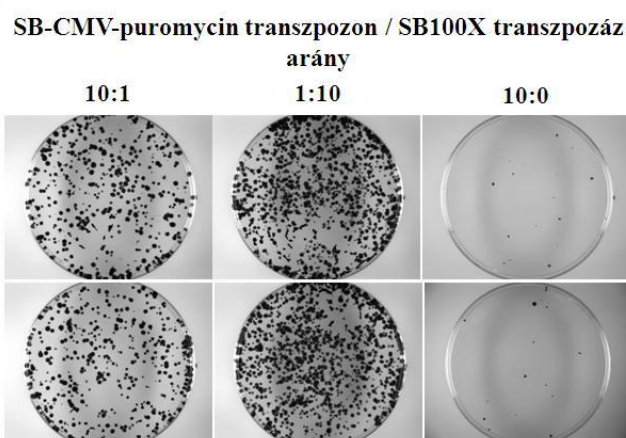
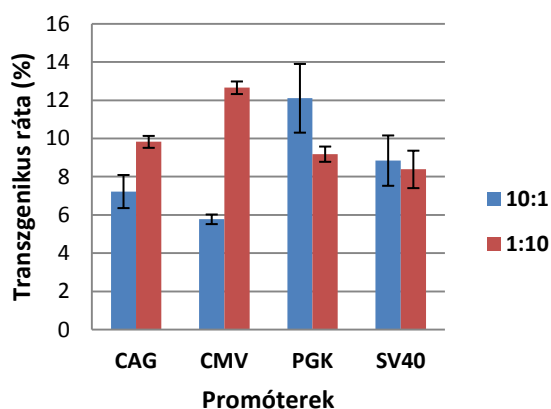
Többféle dóziskombinációban végzett transzpozonos génbevitel szelektált sejt populációinak átlagos kópiaszám meghatározása qPCR-el. **(A)** SB variánsok által produkált átlagos kópiaszámok puromycin-es transzpozon és antibiotikus szelekció alkalmazásával, az IRDR-L esszével mérve. **(B)** SB100X és PB variánsokkal történő génbevitel átlagos kópiaszámai GFP transzpozon és FACS-on végzett szortálás alkalmazásával, GFP specifikus esszével mérve. Parallel transzfectiókból származó szelektált sejtek púlozott gDNS-einek reprezentatív mérései. Az értékek három párhuzamos mérés átlagát mutatják, a hibásávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

A PB kópiaszámának meghatározásához értelemszerűen nem tudtuk alkalmazni az SB IRDR-eire tervezett esszéket. A GFP esszé alkalmasnak ígérkezett arra, hogy ennek segítségével hasonlítsuk össze a PB rendszerrel produkált kópiaszámokat az SB rendszerével. Ehhez a HUES9-ben alkalmazott GFP expresszálo transzpozonokat transzfektáltuk HEK-293 sejtbe. A kotranszfekciókat követő 48ó-nál FACS segítségével szortoltuk a transzfektált sejteket, majd két hét elteltével ismét szortoltuk a transzgenikusan expresszálo GFP pozitív sejteket. Az így kapott populációkból határoztuk meg az átlagos kópiaszámokat a GFP-re specifikus qPCR-el. Mindhárom dóziskombinációról elmondhatjuk, hogy mind az mPB, mind a hyPB jóval kevesebb kópiaszámot eredményezett, mint az SB100X (**34B. ábra**). Elmondhatjuk, hogy a hyPB átlagos kópiaszáma nem tért el számottevően az mPB-től, annak ellenére, hogy a kivágási aktivitása még az SB100X-ét is meghaladta (**28B. ábra**). Tehát a hyPB esetén volt a legmarkánsabban megfigyelhető a HEK-293 sejten, hogy miközben az összes transzpozáz között a legmagasabb kivágási aktivitást mutatta, mindez egyik dóziskombinációban sem korrelált a transzgenikus hatékonyságokkal sem a transzgenikus rátában (**32C. ábra**), sem az átlagos kópiaszámban. A GFP transzpozonnal végzett összehasonlításban az SB100X ismételt alacsonyabb átlagos kópiát eredményezett a transzpozáz dózisének 10:1-ről 10:10-re történő növelésével, mely tendencia gyengén a hyPB esetén is megfigyelhető volt (**34B. ábra**).

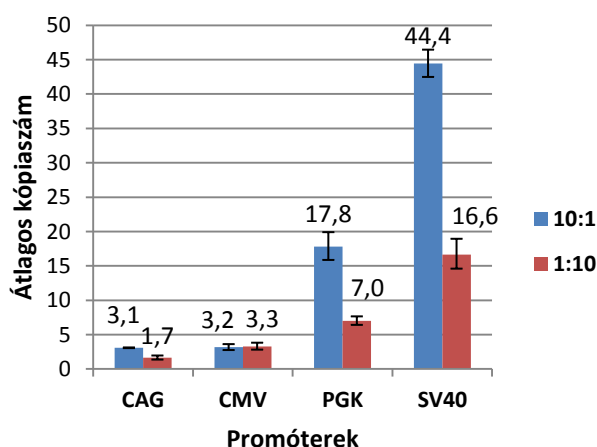
5.5. Transzgenben alkalmazható néhány promóter összehasonlítása a génbevitelben

Az 5.1 fejezetben vizsgáltuk a GFP markert tartalmazó SB transzpozon expresszióját erősnek számító CAG és CMV promóterek alkalmazása mellett HEK-293 sejtben. Az SB100X-al végzett génbevitelen átesett sejtpopulációban a GFP expresszálo sejtek megtartása jelentős különbséget mutatott a két promóter esetén (**16. ábra**). Mivel a csendesülés lehetőségét a vizsgálataink alapján kizárhatjuk, a transzgenikus sejtek arányának különbsége esetlegesen az eltérő hatékonyságú génbevitelnek köszönhető. A promóterek SB-vel történő génbevitelben játszott szerepének kiderítésére parallel módon vizsgáltunk több gyakran alkalmazott promótert: CAG, CMV, PGK, SV40 (*simian virus 40* promótere). A transzgenikus ráta számszerűsítésére a jól alkalmazható puromycin-es rendszert választottuk, és ez alkalommal csak a szélső dózispárosításokat vizsgáltuk a transzgenikus hatékonyságban (**35A. ábra**).

A Transzgenikus ráta



B Átlagos kópiaszám



35. ábra. SB100X transzgenikus hatékonyságának jellemzése HEK-293 sejten a transzgénben alkalmazott promóterek függvényében.

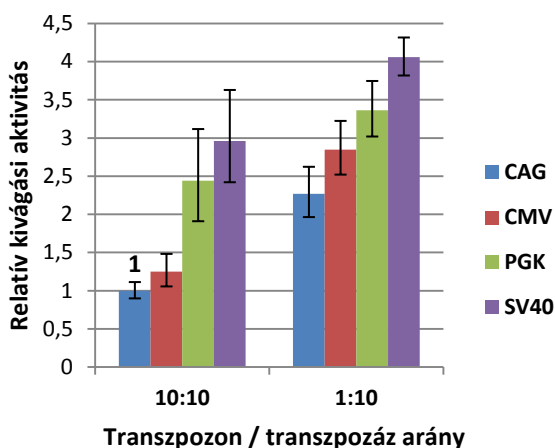
Négyféle promóterrel szabályozott puromycin-es transzpozonnal végzett génbevitel összehasonlítása a szélső dóziskombinációkban. **(A)** Kolóniaesszével meghatározott transzgenikus ráták a CMV kolónia fotóival. Parallel transzfekciók méréseinek átlagát ábrázoltuk, a hibásávok egyszeres szórást jelölnek. **(B)** Ugyanezen transzfekciók 3 hetes szelektiót követő átlagos kópiaszáma IRDR-L esszével. Parallel transzfekciókból származó szelektált sejtek púlozott gDNS-einek reprezentatív mérései. Az értékek három párhuzamos mérés átlagát mutatják, a hibásávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

A transzpozáz *ab ovo* aktivitását jól jellemző alacsony transzpozon dózis esetén (1:10) nem kaptunk jelentős különbségeket a különböző promóterek transzgenikus rátáiban, talán a CMV-puromycin esetén egy kicsit magasabb a transzgenikus sejtek száma. Nagyobb fluktuáció mutatkozott a promóterek között a transzgenikus rátában 10:1 aránynál, bár az egyes promóterek esetén a CMV kivételével jelentős különbségek nem voltak a 10:1 és 1:10 arányok között **(35A)**.

ábra). A CMV-puromycin esetén azonban a magas transzpozon dózis nem kedvezett a transzgenikus rátának, fele annyi transzgenikus sejtet kaptunk, mint az 1:10 aránynál. Érdeemes megjegyezni, hogy a CAG-GFP/CMV-GFP összehasonlításban alkalmazott 10:1 arány esetén a két promóter között nem volt jelentős különbség a kolóniaesszében. Tehát a GFP expresszió megtartásának jelentős különbsége mögött elsősorban a CMV-GFP szelekciós hátránya állhat, melynek a CAG promóterét meghaladó jelentős expresszivitás lehet az oka. Ezt alátámasztja, hogy a CMV-puromycin esetén a nagyobb kópiaszámot produkáló nagy transzpozon dózis kedvezőtlenebb volt a transzgenikus sejtek létrehozásában, mint az alacsony.

Megvizsgáltuk a puromycin-es szelekcióval létrehozott populációk átlagos kópiaszámát, mely a transzgenikus rátákból nem következő meglepő különbségekre mutatott rá a promóterek között (**35B. ábra**). A CAG és CMV promóterek által produkált átlagos kópiaszámok mind a két dóziskombinációban jelentősen alacsonyabbak voltak, mint a PGK és SV40 promóterek által szabályozott transzgenek esetén.

A kópiaszámokban tapasztalt jelentős különbségek arra utalhatnak, hogy a transzpozáz aktivitás eltérhet az egyes promóterek esetén, melyet a kivágás oldaláról is ki tudunk mutatni (**36. ábra**). A különböző promótereket tartalmazó transzpozonok kivágási aktivitása a kópiaszámokhoz hasonló tendenciát produkált, melyet kétféle dóziskombinációban tudunk igazolni.

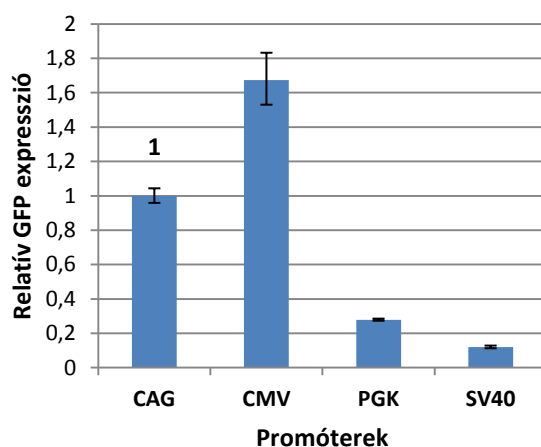


36. ábra. SB100X kivágási aktivitásának jellemzése HEK-293 sejten a transzgenben alkalmazott promóterek függvényében.

Négyféle promóterrel szabályozott transzpozon donor kivágódásának relatív kvantifikálása qPCR-el. Púlozott biológiai párhuzamosok reprezentatív mérései. Az értékek három párhuzamos mérés átlagát mutatják, a hibasávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

Ebben a transzfekeció sorban a 10:1 arányban végzett transzfekeciók esetén a CAG és CMV transzpozoonok kivágása olyan alacsonynak bizonyult, hogy nem volt megbízhatóan kvantifikálható. Az alacsony transzpozoon dózis magasabb kivágási aktivitása látszólagos, a kevesebb donorra történő normalizálás az oka. Alacsony transzpozoon dózis esetén a donor magasabb hányada vágódik ki, mint a nagy dózissal.

A különböző promóter tartalmú transzpozoon kazetták eltérő transzpozíciós affinitása mögött állhat a promóterek szekvenciális felépítése, de okozhatja akár az eltérő transzkripciós aktivitás. Utóbbi jól mérhető, ha a transzgenről átíródó mRNS-t kvantifikáljuk. Ennek érdekében létrehoztuk az egyes promóterek SB transzpozoonjainak GFP-t expresszáló változatait, és önállóan transzfekektáltuk HEK-293 sejtbe. A transiens expresszió alapján a 48. órában FACS segítségével leválogattuk a GFP-t expresszáló sejteket, melyekből qRT-PCR-el megmértük a GFP expressziót (**37. ábra**). A CAG és CMV promóterek jóval erősebb expressziót mutattak a PGK és SV40 promóterekhez képest, és az utóbbiak között is legalább kétszeres különbség figyelhető meg. Elmondhatjuk tehát, hogy a transzpozíciós aktivitás fordítottan korrelál a transzpozoon expresszivitásával, amely azonban jól transzfekektálható sejtek esetén a transzgenikus rátában nem feltétlen jelentkezik.



37. ábra. Promóterek expresszivitásának összehasonlítása HEK-293 sejten qRT-PCR-el.

Négyféle promóterrel szabályozott SB GFP transzpozoonnal transzfekektált GFP pozitív sejteket szortoltunk transzfekeciót követő második napon FACS segítségével, majd GFP mRNS szinteket mértünk. Az értékek három párhuzamos mérés átlagát jelentik, a hibasávok 95%-os konfidencia intervallumokat jelölnek.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. SB transzgén expressziójának és csendesülésének vizsgálata

A *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszer laboratóriumunkba történő bevezetését olyan vizsgálatokkal kezdtük, melyek a génbevitel/génmegtartás dinamikáját vizsgálták. Az *ex vivo* génterápiát modellező sejt kultúrák rendszerünkben a szelekció génmegtartásra gyakorolt markáns hatása figyelhető meg, melyet számos egyéb applikáció alkalmával szintén tapasztaltunk. Bármely transzpozon kazetta esetén megfigyelhető, hogy a transzpozon donorral transzfektált sejtek dúsítása nélkül jóval kevesebb transzgenikus sejt marad a populációban, mint amelyet a dúsított transzfektált sejtek arányában tapasztalhatunk. A dúsítatlan populációban a transzgenikus GFP expresszáló sejtek aránya a negyedik héten kevesebb, mint negyede a transzfekeiót követően mért sejtmennyiségnek (**14. ábra**). Ezzel ellentétben ugyanazon transzfekeió leválogatott transzfektált sejt populációjában akár 80%-os transzgenikus GFP expresszió is megfigyelhető ugyanazon időpontban (**16. ábra**). A transzgén expresszió szelekciós hátrányt jelent a transzgént tartalmazó sejtek számára a nem transzfektált, illetve nem transzgenikus sejtekhez képest. Az expresszáló sejtek kezdeti dúsítása a génterápiás felhasználásokban is előnyös lehet.

A génterápia sikerének egyik kulcsa a sejtekben kifejeződő transzgén megfelelő mennyisége, melyet a transzgén kópiaszáma és az expressziót szabályozó promóter erőssége határoz meg. Ezért az első kísérleti rendszerünkben erősnek számító promótereket alkalmaztunk, melyek általában virális *enhancer* elemeket tartalmaznak, mint a CAG és a CMV promóterek. Az integrálódott provírusokhoz hasonlóan a virális elemeket tartalmazó transzgének esetén is megfigyelhető csendesülés [266-268], elsősorban a promóter régió metilációján keresztül [269], melyet állatmodellen alkalmazott virális génbevitel esetén is tapasztaltak [270]. A transzgén csendesülésének más okai is lehetnek, például a heterokromatikus régiókat érintő integrációk pozícionális hatása [271, 272], vagy a véletlenszerű beépüléseknél előforduló konkatamer integrációk [201]. A transzpozon integrációk nem eredményeznek multimer formákat, azonban az ITR-ek transzpozon belseje felé irányuló transzkripció aktivitása miatt bidirekcionális (szensz és antiszensz) transzkriptumok várhatók [273, 274], melyek az RNS interferencia jelenségén keresztül csendesítettséget eredményezhetnek [275].

Génbeviteli modellrendszerünkön két különböző időpontban teszteltük a CAG-GFP és CMV-GFP transzgének expressziójának csendesülését. Közvetlenül a transzfekeiót követően (48. óra), mind a transzpozon donor plazmid közvetlen (episzómális) expressziójára ható csendesülést, mind pedig az esetlegesen már integrálódott transzgén csendesülését detektálhattuk TSA kezelés

alkalmazásával. A transzfektált sejtek legalább 10%-ában teljes csendesülés volt megfigyelhető (**13A. ábra**), mely sejtek elveszíthetők, ha a tranziens expresszió alapján dúsítást végzünk. A négy azonos mennyiségű donorról végzett transzfekcióból egyetlen esetben jelentősebb, a transzfektált sejtek 40%-át érintő csendesítettséget mértünk, mely valószínűleg véletlenszerű, azonban statisztikus gyakoriságának megállapítására több transzfekció TSA kezelésére lenne szükség. A teljes episzómális csendesülést leggyakrabban a plazmid bakteriális gerincének jelenléte váltja ki, mely kromatin módosuláson keresztül valósul meg, és amely a gerinc méretének minimalizálásával csökkenthető [276, 277]. HEK-293 sejteket vizsgálva modellrendszerünk csak kevés sejtben váltott ki teljes mértékű csendesülést. Ellentétben a CAG-GFP-vel, a CMV-GFP esetén jelentős intenzitásbeli csendesülést is megfigyelhettünk a 48. órában az expresszáló sejtekben (**13B. ábra**), amely arra utal, hogy a túlzott mértékű expresszió a sejt csillapítását váltja ki a megterheléssel szemben, amennyiben nincs teljes mértékű csendesítés. A transzgen későbbi genomiális csendesítettségét külön vizsgáltuk. Szeparáltuk a transzfektálódott sejteket, és a transzfekciót követő hatodik héten Aza kezeléssel teszteltük őket. A csendesítéssel való védekezés a sejt *fitness*-ének megőrzését célozza, ezért feltételeztük, hogy ezek a sejtek nem eliminálódnak a populációban tartott csoportból és az ilyen sejtekben a derepresszáló kezelés hatására megjelenik a GFP expresszió. Aza kezelés hatására nem detektáltunk olyan sejteket, amelyekben teljes genomiális csendesítettség történt volna a génbevitelt követő 6. hétig (**15A. ábra**). Azonban mind a CAG-GFP, mind a CMV-GFP kazetta esetén megfigyelhető volt intenzitásbeli csendesítettség (**15B. ábra**), amely csillapítás mindkét promóter erőteljes expresszivitásának megterhelő voltára utal.

A kedvezőtlenebb CMV-GFP expresszió a dúsított sejtpopulációk GFP pozitivitásának hosszú távú követésében jelentős különbséget eredményezett. Szemben a CAG-GFP transzpozonnal a CMV-GFP expresszáló sejtek aránya állandó csökkenést mutatott (**16. ábra**). A transzgen csendesülésének lehetőségét a vizsgálataink alapján kizárhatjuk, ezért a csökkenés a CMV promóter által szabályozott expresszió erőteljesebb szelekciós hátrányára utal. Noha teljes transzgenikus csendesítettséget nem tapasztaltunk a CAG és CMV promóterek alkalmazásánál, a jelentős aktivitás mindkét promótert kedvezőtlené teheti a transzgen expressziójára, emellett a különböző transzgenek esetén eltérő sejtes tolerancia várható. A szelekciós hatás kiküszöbölésére és az optimális dózis elérésére az intenzitásbeli csendesülés elkerülése fontos lehet. A génterápiás alkalmazásokban a virális promóterek endogén promóterre történő cseréje kedvezőbb transzgen expressziót eredményez [278], mégis számos esetben virális promótert alkalmaznak a transzponon rendszerek génbeviteli hatékonyságainak tesztelése során [217, 220, 221].

6.2. Transzpozáz aktivitás, valamint kópiaszám mérésére alkalmas módszerek

A transzpozáz aktivitást mind az *in vitro* mind az *in vivo* rendszerekben, számos esetben a kivágási termék mennyiségével jellemzik [105, 192]. A kivágási aktivitás gyors és egyszerű qPCR-es monitorozását választottuk összehasonlító vizsgálataink elvégzésére, melyet a technikai megbízhatóság tesztelésén kívül azzal validáltunk, hogy a különböző SB transzpozáz variánsok hasonló aktivitási különbségeket mutattak különböző sejtípusokban (**25. ábra**). A transzpozáz aktivitásának fejlesztésében elfogadott tesztelési módszer a kivágás monitorozása [190, 192], melyet az adott tesztrendszerben elért eredménnyel jelölnek, és amelyet általában az eredeti variánsra vonatkoztatnak (pl. SB32, SB100X). A különböző mérési módszerek eltérő számszerű különbségeket eredményezhetnek a kivágási aktivitásban, amely azonban várhatóan tendenciálisan reprodukálható. Jin és kollégái a miénkhez teljesen hasonló qPCR-es rendszert állítottak be [193], azzal a különbséggel, hogy TaqMan kémiát alkalmaznak, ahol a próba a kivágás helyének közvetlen környezetére specifikus. A plazmidból történő kivágás javítása azonban jelentős számban hibákat eredményez (**23. ábra**), melyek között hosszabb deléciók is előfordulnak [279], ezért a próba alkalmazásával némely kivágási terméket potenciálisan nem detektálhatunk. Mindazonáltal a szerzők a gátlás jelenségét módszerükkel szintén tudták monitorozni.

Az integrációk kópiaszám mérésének beállítása során azt a célt tűztük ki, hogy analízisünkkel az egész számú kópiákat meg tudjuk különböztetni egymástól a genetikailag uniformis klónokban, melyet a különböző klónok mérési eredményének diszkrét eloszlása igazolt (**21. ábra**). Az analízis beállítási stratégiája számos transzpozon tartalmú klón létrehozása volt, melyek közül az egykópiásokat referenciaként alkalmazzuk és relatív kvantifikálást végzünk. A plazmid segítségével végezhető abszolút kvantifikálás körülményes, és eredménye gyakran megerősítésre szorul. Mégis számos genomialis kópiaszám meghatározásban ezt a módszert választják [280-282], mert az ismert kópiaszámú referencia minták előállítás és validálása nehézkes, vagy egyáltalán nem megoldható. Optimalizált méréseink több okból tekinthetők megbízhatónak: 1., a relatív kvantifikálásban legkisebb jelszintet produkáló klónok jelszintjei uniformisak (**20B. ábra**); 2., ezek a klónok valóban a legalacsonyabb expressziót mutatták, és a többi klón kópiaszámai is korreláltak az expresszivitással (**19. és 20B. ábra**); 3., az egykópiás klónok abszolút kvantifikálással megerősíthetők (**18. ábra**); 4., a transzgen különböző szekvenciáinak mérése egybehangzó kópiaszámot eredményez (**21. ábra**); 5., hagyományos módszerekkel meghatározott ismert kópiaszámú klónok mérései a korábban meghatározott kópiaszámokat adták (**2. táblázat**). Módszerünk nagy előnye, hogy a transzpozon IRDR-ekre

specifikus esszék függetlenné teszik a mérést a transzgén tartalomtól, valamint mindkét IRDR kvantifikálása szűrést tesz lehetővé a teljes transzpozon kazetta jelenlétére. Jin és kollégái szintén megbízható SB kópiaszám meghatározást állítottak be [193]. Bár abszolút kvantifikálással mérnek, melyet az RNáz P-re is elvégeznek, azonban egykópiás sejtklónt alkalmaznak a standard görbe előállítására. Módszerük valójában az egykópiás referenciát alkalmazó relatív standard görbe módszer alternatívája. Esszékkel a transzpozon tartalom szekvenciáját kvantifikálják, amely más transzgén esetén nem alkalmazható.

6.3. SB integrációs helyek meghatározása és karakterizálása

Az SB transzpozázzal kivitelezett génbeviteleinket az integrációs helyek meghatározásával validáltuk. A szűrőpróba szerűen azonosított integrációk mindegyike transzpozáz aktivitásnak volt köszönhető, mert az IRDR-eket a TSD-k, valamint genomiális szekvenciák határolták. A három leghatékonyabb transzpozonos rendszer közül az SB rendelkezik a leginkább random integrációs profillal [210, 211]. A PB és a *Tol2* rendszerek ezzel ellentétben jobban preferálják a géneket és azok szabályozó régióit [283-285]. Az általunk azonosított integrációk kevés száma miatt a random profil rendszerünkben történő teljesülése nem megítélhető. Mindazonáltal egyetlen esetben sem találtunk kódoló, vagy transzkripció start hely közeli 5'UTR integrációs szekvenciát (**3. táblázat**). Az integrációk 7:3 arányban takartak intergenikus, illetve intronikus szekvenciákat, mely a fehérjét nem kódoló és kódoló régiók arányát tükrözi a genomban [16]. Az 1p31 lókuszon azonosított három különböző integráció regionális preferenciát takarhat, melynek statisztikus megerősítésére több független génbeviteli kísérlet integrációinak meghatározására lenne szükség. A különböző vizsgálatokban nem számoltak be az SB bármilyen integrációs „forrópontjáról”, ennek ellenére nem zárható ki, hogy bizonyos körülmények eredményezhetnek preferenciát.

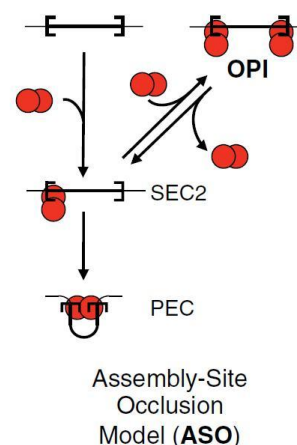
Noha integrációink statisztikusan nem reprezentatívak, mégis megfigyelhető az SB-re jellemző integrációs szekvencia karakteres „fűrész profil” Vstep görbéje (**26. ábra**) [263, 286, 287]. Az azonosított helyek között az egyes görbe karakter kategóriák eloszlása szignifikánsan különbözik a genomban található TA szekvenciák eloszlásától (**4. táblázat**). A mi eredményünk alapján a teljes fűrész profil relatív preferenciája 20-szoros a genomban található leggyakoribb indifferens profilhoz képest, míg a statisztikusan jelentősebb vizsgálatokban 10-15-szörös preferenciáról számoltak be [263]. A szabályosságot veszítő hélix struktúra térbeli optimumot szolgáltat a transz-észterifikációs reakció létrejöttéhez, és a célhely DNS-ének hajlíthatóságát teszi lehetővé a kötődő preintegrációs komplex transzpozáz monomerei számára. Karakteres hélix struktúra preferencia számos bázisszekvenciától független, aspecifikus módon kapcsolódó fehérje

esetén megfigyelhető nem csak a DDE(D) típusú integrázoknál [61, 288, 289], hanem a retrotranszpozon elemeknél is [290]. A nukleoszómák létrejöttkor kötő hisztonok például az AT gazdag részeket preferálják [291], melyek szintén növelik a hajlíthatóságot, és melynek preferenciája az SB esetén is megfigyelhető [287]. Az általunk azonosított integrációs helyek szekvenciális környezetének AT denzitása azonban nem tért el szignifikánsan a genomra jellemző átlagtól. Jóllehet az SB célhelyeinek genomiális eloszlása teljesen véletlenszerű, azonban a DNS strukturális jellegzetességei miatt lokálisan nem random. Az integrációk fele az adott régióban rendelkezésre álló TA helyeknek csak 10%-át érinti, így a várható pozíciók megjósolhatók.

6.4. Túltermeléses gátlás

Míg egyes „cut and paste” transzpozázok monomerként-, némely Tc1/*mariner* transzpozáz dimerként fordul elő az oldatokban és a gél-filtrációs kísérletekben [75, 292-294]. Az oligomerizáció valamilyen módon gátolhatja a transzpozíciót, jóllehet a monomerek dimerizációja természetes velejárója a transzpozozóma létrejöttének és a kanonikus transzpozíciónak. Az *in vitro* EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) kísérletekben a *mariner* transzpozáz többségében dimer formájában képez komplexet a transzpozon egyetlen szekvenciájával (SEC2 – *Single End Complex 2*) [68, 295, 296]. Emellett csak ez a forma képes katalizálni az első szál vágását [68, 295], mely a *Hsmar1* esetén még a szinaptikus komplex (PEC – *Paired End Complex*) létrejötte előtt lezajlik. A teljes szinaptikus komplex instabilitása miatt azonban *in vitro* gyakran egyáltalán nem detektálható.

A tények tükrében az OPI jelenség magyarázatára felállították az úgynevezett ASO modellt (*Assembly-Site Occlusion*). A transzpozíció akkor valósul meg, ha csak az egyik transzpozon szekvencia köti a transzpozáz dimert (38. ábra) [105]. Ebben az esetben a SEC2 végül befogja a másik üres transzpozon szekvenciát, így jön létre a PEC (S-NEC, *Synapsis by Naked End Capture*). Magasabb transzpozáz koncentráció esetén (OPI) mindkét transzpozon végen SEC2 alakul ki, mely gátolja a PEC létrejöttét.



38. ábra. A túltermeléses gátlás (OPI) feltételezett mechanizmusa.

Részletes magyarázatot ld. a szövegben. (Bouuaert, *Elife*, 2013, ábrája alapján.)

Az ASO modell előrejelzi, hogy a gátlás jelentkezését a szubsztrát-enzim arány határozza meg, és nem az abszolút transzpozáz koncentráció, amit a *Hsmar1* esetén *in vitro* kísérletekkel igazoltak [105]. A gátlást elsősorban az teszi lehetővé, hogy a SEC2 affinitása a másik kötetlen transzpozon szekvenciához jóval kisebb, mint az oldatban lévő transzpozáz affinitása [89]. Ennek köszönhetően az üres transzpozon végen könnyebben alakul ki egy másik SEC2, mint a PEC. Az allosztérikus jelenség annak köszönhető, hogy a dimer ITR kötésével megszűnik a komplex szimmetriája, így a SEC2-ben az üres DNS kötő domén alacsony szabadsági fokkal rendelkezik. Ugyanez a jelenség csökkenti az aberráns transzpozíció lehetőségét is.

Az ASO modell nem zárja ki, hogy az egyébként monomer formájában jelen lévő transzpozázok esetén is létrejöhet hasonló gátlás. A *Himar1 in vitro* rendszerben vizsgálva, tetramer formában képez komplexet az ITR-el [295], jóllehet a transzpozon szekvenciák csak egyetlen transzpozáz kötőhelyet tartalmaznak, és a PEC-ben minden bizonnyal dimer szerepel aktív multimerként. Ennek ellenére nem mutatható ki a *Himar1* ITR nélküli dimer vagy multimer formája az oldatban [295], aminek alapján feltételezhető, hogy a multimer az ITR-en csak a monomer kötését követően alakul ki, és az *in vitro* is megfigyelhető OPI jelenségét tükrözheti (**10. ábra, pontozott vonal**). A monomer koncentrációjának növekedésével esetleg nagyobb az esély az ITR-en történő multimerizációra, mint a másik ITR monomer kötésére. Az allosztéria pedig csökkenti a PEC létrejöttének esélyét (S-NEC), és növeli a másik ITR lefoglalásának lehetőségét.

Más transzpozázok esetén nincs *in vitro* adat a gátlás vizsgálatára, azonban az *in vivo* sejtes génbeviteli kísérletekben némely rendszerrel megfigyelhető. A PEC-ben dimerként működő PB és a hAT családkhoz tartozó *Tol2* esetén csökken a hatékonyság valamely transzpozáz dózis felett [215, 217]. Bár a *Tol2* esetében megfigyeltek multimer formát *in vitro* [297], a PB-nél ilyet nem detektáltak [66]. Szintén megfigyelhető a sejtes génbeviteli kísérletekben az OPI a tetrameres szinaptikus komplexben működő SB esetén [217, 220-223]. Az ASO modell a tetrameres működés esetén sem zárható ki, mert a belső DR kötőhely affinitása mindkét ITR-ben magasabb, mint a külső DR-é [265], amely feltételezi, hogy a szinapszis már a belső kötőhely részvételével is kialakulhat, de csak a tetramerizáció után eredményez transzpozíciót. Tehát a magasabb koncentráció okozta multimerizáció elsőként a magasabb affinitású kötőhelyet érinti, mely kizárja a két ITR megfelelő orientációjú szinapszist.

A sejtes génbeviteli kísérletekben végzett vizsgálatok azonban nem mutatnak konzekvens eredményeket az OPI tekintetében. A PB és a *Tol2* esetén például nem minden vizsgálat mutatja ki a gátlást, annak ellenére, hogy ugyanazon tanulmányban másik transzpozonos rendszer esetén észlelték [178, 215, 216]. Ennek háttérében állhatnak az eltérő sejtípusok, illetve kísérletes

körülmények. Ugyanez elmondható a *Mos1*-ről, ahol az *in vitro* transzpozíciós esszékben nem észlelhető OPI [59, 298], ennek ellenére *in vivo* megfigyelhető valamilyen gátlás [106].

A génbevitel optimalizálásának részeként teszteltük a túltermeléses gátlás jelentkezését. A donor helyről történő kivágódás a transzpozáz aktivitását közvetlenül jellemzi, ezért a gátlás jelenségét a kivágódás mérésével karakteresen lehet monitorozni [105, 193]. Vizsgálataink alapján sejtes génbeviteli rendszerünkben detektálható volt az OPI a kivágódás oldaláról, mert a kivágási hatékonyság csökkenése a transzgenikus rátában is jelentkezett (**27B. és 31B. ábra, 10:20 arány**). A gátlás azonban kizárólag a PB rendszerek esetén volt megfigyelhető, mely kielégítő hatékonyságú transzfekciós módszerek alkalmazása mellett a transzpozon donort meghaladó extrém transzpozáz dózisok esetén jelentkezett, és mértéke nem volt számottevő. A hyPB esetén is megfigyeltük a kivágási hatékonyság csökkenését HUES9 sejten (**29B. ábra**). Ezzel ellentétben az SB100X-al végzett génbeviteli kísérletekben a transzpozáz dózisának növelése a kivágási hatékonyság folytonos növekedését vonta maga után minden esetben (**27. és 29A. ábra**), amely a transzgenikus rátában azonban inkább telítést eredményezett (**31. ábra**). Mindez szöges ellentétben áll az irodalmi adatokkal, ahol az SB100X esetén markáns gátlást tapasztaltak [217], melyet alacsony transzpozon dózis alkalmazásával sem tudtunk előállítani (**31C. ábra**). Az ASO modellben a transzpozon/transzpozáz arány határozza meg a gátlás jelentkezését, amely kevés szubsztrát esetén már alacsony transzpozáz dózissal jelentkezik [105, 217].

Az OPI-t érintő ellentmondásos eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a génbevitelben alkalmazott transzpozonoknál sejtes faktorok közvetíthetik a tapasztalt gátlás jelenségét. Ezzel összefügghet az a megfigyelés, hogy számos GFP-vel fuzionált transzpozáz dózistól függő módon aggregátumokat képez a sejt különböző lokalizációiban [299]. Eredményeink azt támasztják alá, hogy a sejtes közegben mutatott túltermeléses gátlás kevésbé jól körülhatárolható jelenség, amely nem feltétlen prediktálható, ezért a génbevitel optimalizálása minden applikáció esetén ajánlott.

6.5. SB és PB transzpozonos rendszerek hatékonyságvizsgálatai

Hatékonyságvizsgálataink egyik konklúziója a transzpozonos rendszerek markáns sejtípus függése. Valamennyi transzpozonos rendszer esetén megfigyelhető volt, hogy a HEK-293 sejt bizonyult a leginkább permisszívnek a kivágási aktivitások tekintetében (**30. ábra**). HeLa-hoz képest néhányszor magasabb kivágási aktivitásokat tapasztaltunk (**30A. ábra**). Az SB transzpozázzal interaktáló és aktivitást növelő NHEJ rendszer szerepét vizsgálatainkkal kizártuk,

mert ezek expressziója nem különbözött a két sejttípus esetén, és a *repair* faktorok expressziós indukálódása sem volt megfigyelhető. A transzpozázok aktivitására a HUES9 sejtvonal mutatkozott a legkevésbé permisszívnek, ahol egy nagyságrenddel alacsonyabbak voltak a kivágási aktivitások az SB és PB rendszerek esetén, mind a HEK-293, mind pedig a HeLa sejtekhez képest (**30B. ábra**). A jelentős aktivitásbeli különbség többek között a sejtek expresszivitását is tükrözheti, amellyel a transzpozázot kifejezik. Az embrionális őssejtek például jelentősen csendesítik az exogén templátok expresszióját, amely például magas *de novo* DNS-metil-transzferáz aktivitásuknak köszönhető [300].

Az mPB kivágási aktivitása HEK-293 sejten az SB32 variánséhoz volt mérhető, míg HeLa sejten az aktivitása nem haladta meg az SB11-ét (**30A. ábra**). Ugyanakkor HUES9 sejten az mPB aktivitása az SB100X-éhoz volt hasonló (**29A. ábra**), amely a transzgenikus hatékonyságot jellemző GFP indexekben is tükröződött (**33B. és C. ábra**). Ez arra enged következtetni, hogy a PB sejttípus függése eltérő lehet az SB-hez képest, és a PB számára az embrionális őssejtek jóval kedvezőbb környezetet jelentenek, amely sejtes faktorok szerepét valószínűsíti. A PB sejtes faktorokkal való közreműködését eddig kevésbé vizsgálták. Mindezt alátámasztják az irodalmi adatok, ahol az SB100X és PB variánsok összehasonlításaiban eltérő eredményeket mutatnak. Optimális donor/*helper* arány mellett HeLa sejten eredményeinkkel egybehangzó módon hatékonyabbnak találták az SB100X-at, mint az mPB-t, bár a különbség nem volt számottevő [217]. Ugyanakkor HSC-ken az SB100X által elérhető génbeviteli hatékonyság jóval meghaladja az mPB hatékonyságát [217, 218]. Más tanulmányban pedig mind a hyPB-, mind az mPB-, de még az eredeti PB is jobbnak mutatkozott az SB100X-hoz képest [191, 219], némely esetben sokszoros különbséggel. Vizsgálataink azt mutatják, hogy ezeket az eltéréseket sejtes faktoroktól való függés is okozhatja, és az általános vélekedéssel ellentétben az OPI-ra való hajlam esetünkben nem magyarázza. Ellentétben a HEK-293 és HeLa sejtekkel, embrionális őssejteken hasonló vagy magasabb hatékonyság elérésére képes mind az mPB, mind a hyPB az SB100X-hoz képest (**33B. és C. ábra**), és hasonlóan alacsony átlagos kópiaszámok érhetőek el (~2-3). A hyPB szintén hatékonyabbnak bizonyult T sejteken, valamint egérkísérletekben farokvénán keresztül végrehajtott *in vivo* alkalmazásban [191]. A PB köztudott integrációs génpreferenciája azonban kevésbé előnyös, és az SB100X hasonlóan jó hatékonysággal alkalmazható például az embrionális őssejteken akár a hyPB-hez képest is.

Összefoglalva a transzgenikus ráták tesztelését elmondhatjuk, hogy azok számos esetben nem tükrözték a kivágási aktivitásokat. A kivágási aktivitásban jóval permisszívebb HEK-293 sejten mutatott transzgenikus ráták alacsonyabbak voltak a HeLa sejthez képest, mely alól az SB11 talán kivétel (**32A. ábra**). Másik markáns eltérés, hogy amíg az SB variánsok kivágási

aktivitása tükrözte a transzpozáz „fejlesztési” aktivitását mindkét sejt típuson (**25. ábra**), a HeLa sejtekkel ellentétben HEK-293 sejten az SB32 kétféle dóziskombinációban is magasabb transzgenikus rátát eredményezett, mint az SB100X (**32B. ábra**). (A 28A. és 32B. ábrák ugyanazon transzfejekciók kivágási és transzgenikus mérései.) Harmadik szembevető ellentmondás, hogy a kivágásban kimagaslóan legaktívabb hyPB (**28B. ábra**) transzgenikus rátája alig különbözött az mPB-től (**32C. ábra**). (Az ábrák ugyanazon transzfejekciók mérései.) Továbbá a transzpozáz dózisának emelése a jóval magasabb kivágási aktivitások ellenére a transzgenikus rátában telítést mutat az összes rendszer tekintetében (**28. és 32B. C. ábra**), amely alól az SB11 az egyetlen kivétel, ahol a transzgenikus ráták a transzpozáz dózisok kivágási aktivitásait tükrözik HEK-293 sejten. (A mérések szintén ugyanazon transzfejekciókból származnak.) A limitált transzgenikus hatékonyságok felvetik a sejtek transzgenel szembeni toleranciájának problémáját, jóllehet a génbeviteli kísérletek során általában nem tapasztalunk a sejt kultúrákban számottevő pusztulást a kontrollhoz képest.

Az integrációs hatékonyságot az elérhető kópiaszámok szintén jellemzik, melyben markáns különbség mutatkozott az SB és a PB rendszerek összehasonlításában. Utóbbiak jóval alacsonyabb kópiaszámok elérésére képesek, és a kivágási aktivitásban még az SB100X-at is túlszárnyaló hyPB – a transzgenikus hatékonysághoz hasonlóan – a kópiaszámokban sem bizonyult sokkal hatékonyabbnak az mPB-hez képest (**28B. és 34B. ábra**). Az mPB és a hyPB ugyanazon transzgen bevitel mellett produkált alacsony kópiaszám gyenge integrációs képességet tükröz a HEK-293 sejtekben. Esetükben nem a sejtek limitált toleranciája okozza a kivágás és az integráció között jelentkező különbséget, hisz az SB100X magasabb kópiaszámokra képes. Megfigyelhető továbbá, hogy a transzpozáz dózisának 10:1-ről 10:10-re történő emelése több esetben alacsonyabb átlagos kópiát eredményez – SB11, hyPB, és SB100X két független kísérletben (**34. ábra**). Limitált sejtes tolerancia esetén az átlagos kópiaszámokban is limitációt várnánk csökkenés helyett. Ezzel ellentétben inkább valamiféle, az integrációs oldalon megnyilvánuló gátlás valószínűsíthető ebben az esetben.

Elmondhatjuk tehát, hogy mind a transzgenikus ráták, mind az átlagos kópiaszámok számos esetben nem tükrözik a kivágási aktivitást, amely nem feltétlen indokolható limitált toleranciával. Bármi legyen is ennek hátterében, a kivágást nem minden esetben követi integráció, ami különösen igaz a PB rendszerekre. Ezt alátámasztja, hogy az iPS előállítására bevitt PB kazetta kivágását meg tudták oldani az mPB transzpozáz önálló transzfejekciójával [236, 237]. Mindez arra utal, hogy a transzpozíció két lépése nem kapcsolt, hanem kinetikailag elkülönülő folyamatok, amelyre bizonyíték az integráció-defektív transzpozáz variánsok előállításának lehetősége [238], és amelyet az SB esetén is megoldottak (nem publikált adat).

Az előbb tárgyaltak fölvetik annak a lehetőségét, hogy a kivágási és integrációs aktivitások *ab ovo* eltérhetnek az egyes transzpozáz variánsok esetén. Mindemellett az aktivitás fejlesztésekor rendszerint a kivágást monitorozzák, és a hiperaktív variánsok transzgenikus hatékonysága szintén nem korrelál a kivágással az adott tesztrendszeren. (Az SB100X például százszoros kivágási és csak 80-szoros integrációs aktivitásemelkedést mutat [192], vagy a hyPB-t 17-szeres kivágási és csak 9-szeres integrációs emelkedés jellemzi [190].) A szubsztrát limitációjával kapott transzgenikus hatékonyságok azonban jól tükrözik a kivágási aktivitásokat HEK-293 sejten (**32B. ábra, 1:10 arány**), és ez cáfolja a két lépés hatékonyságának *ab ovo* eltérését. A szubsztrát limitáció jól modellezi a nehezen módosítható sejteket, melyekben valóban a legaktívabb variánsok eredményeznek kielégítő transzgenikus hatékonyságot, ahogy az általunk vizsgált HUES9-ben is (**33B. és C. ábra**). A szubsztrát limitáció egyben a kópiaszám csökkentésének is hatékony módja (**34. ábra**), és a transzpozon dózis mérsékelése jól transzsfektálható sejtekben nem csökkenti számottevően a hiperaktív variánsok transzgenikus hatékonyságát (**32B. és C. ábra**).

6.6. Transzgénben alkalmazható néhány promóter összehasonlítása a génbevitelben

A transzgén expressziós megtartási dinamikáját vizsgáló kísérleteink az erős promóterek intenzitásbeli csillapítását és szelekciós hátrányát mutatják, különösen a CMV promóter esetén. Mindez felveti annak a lehetőségét, hogy a különböző promóterek a génbeviteli hatékonyságot eleve befolyásolhatják a sejtek expresszióval szemben mutatott toleranciája miatt, hatékonyságvizsgálatainkban ezért alkalmaztuk jórészt a PGK endogén promótert. Ezek után azt vizsgáltuk, hogy a magas és alacsony transzpozon dózis hogyan befolyásolja a különböző promóterek esetén a transzgenikus rátát. A CMV promóterrel szemben sejtett intoleranciát igazolta a magas transzpozon dózisban tapasztalt alacsonyabb transzgenikus ráta (**35A. ábra, 10:1 és 1:10 arány**). Mindez a szintén erősnek számító CAG promóter esetén már nem volt megfigyelhető, és az egyes promóterek transzgenikus rátái ettől eltekintve nem mutattak jelentős eltéréseket. Továbbá egyik promóter esetén sem tapasztaltunk OPI-t a transzgenikus rátában, mert az 1:10 arány nem eredményezett alacsonyabb hatékonyságot. A különböző promóterekkel kapott átlagos kópiaszámok fordított korrelációt mutattak az expresszivitással (**35B. és 37. ábra**), amely szintén tükrözheti akár az expresszivitással szemben mutatott toleranciát is. A kivágási aktivitást azonban feltehetően nem befolyásolja a sejtek későbbi toleranciája. A kivágási hatékonyságok a kópiaszámokhoz hasonlóan fordítottan korreláltak az expresszivitással (**36. ábra**), tehát a promóter aktivitás *ab ovo* befolyásolja a transzpozíció hatékonyságát, amely jól transzsfektálható sejtekben nem feltétlen tükröződik a transzgenikus rátában.

Az SB transzpozon donor kromatinizációs állapota befolyásolja a transzpozíció hatékonyságát, mert az *in vitro* metilált transzpozon donor hatékonyabb génbevitelt tesz lehetővé az egérben, és a transzgén az embrionális epigenetikai újraprogramozás során felszabadul a represszió alól [301]. A hatékonyságnövekedést nem a metilált IRDR-ek eltérő affinitása okozza, hanem az egész transzpozon donor DNS kompaktsága [302], amely az IRDR-eket közel hozza egymáshoz. Hasonló okból a donor plazmid szuperhelikális struktúrájának létrehozása az *in vitro* hatékonyságot szintén növeli [105]. Feltételezhető, hogy a transzkripció apparátus folytonos jelenléte sztérikus ok miatt nehezíti az IRDR-ek szinapszist.

Végül, ha „használati utasítást” szeretnénk adni az SB transzpozonos rendszer sejteken történő alkalmazásához, először fontos annak megítélése, hogy a célsejtek nehezen (max. 10-15%), vagy könnyen (min. 40-50%) transzfektálhatók. Nehezen transzfektálható sejteken a magas transzpozon dózis és a legaktívabb SB100X alkalmazása eredményez kielégítő transzgenikus sejtszámot, és csak alacsony, átlagosan néhány kópiát. Könnyen transzfektálható sejteken a magasabb hatékonyság miatt az erős promóterek alkalmazása (pl. CMV) a sejteket még a kevésbé ártalmas GFP transzgén esetén is megterheli, ezért az expressziós intenzitás csendesítésével védekeznek, és szelekciós hátrányba kerülnek. Emiatt az erős promóterek könnyen transzfektálható sejteken történő alkalmazása csak alacsony transzpozon dózis mellett javasolt. A közepes vagy gyenge erősségű endogén promóterek használata előnyösebb lehet (pl. PGK), ezeket az SB hatékonyabban tudja mozgatni, és az expressziós szint a kópiaszámon keresztül „beállítható”. Magas transzpozon donor dózis esetén magas átlagos kópiaszámot várhatunk, míg alacsony transzpozon dózis esetén csak néhány kópiát. A transzpozáz dózisa a túltermeléses gátlás jelensége miatt azonban optimalizálásra szorulhat, bár mivel esetünkben ez nem volt megfigyelhető, ezért a vizsgált rendszerekben a transzpozáz magas dózisban is alkalmazható.

A genetikai manipulációk forradalmi fejlődést mutatnak jelen korunkban, mely az eszközök egyre szélesebb tárházát biztosítja a számos organizmus módosítására, valamint a különböző kutatási célokra. A transzpozonok a vírusokéhoz hasonló hatékonyságot biztosítanak jóval alacsonyabb károsító eséllyel. (Főleg az SB rendszer.) A rendelkezésre álló eszközök előnyei és hátrányai meghatározzák a különböző célok elérésében való alkalmazhatóságot, de az egyes eszközök kombinálására is számos példát találunk. A ZFN/TALEN-nukleázok és a CRISPR-Cas9 rendszerrel végrehajtható „genom editálás” exponenciálisan fejlődő terület, mely a meglévő DNS szekvenciák célzott specifikus módosítását teszi lehetővé, ezért a génterápia ígéretes eszközévé válhat. A biztonságosság és a hatékonyság szempontjából azonban egyelőre fejlesztésre szorul, és elsősorban rövid DNS szakaszok célzott módosítását teszi lehetővé. A

transzpozonos rendszerek méretes genetikai tartalom hatékony bejuttatására képesek bármilyen sejtípusban. Ez elsősorban annak köszönhető, hogy nem függenek a homológia alapján működő javító rendszerektől, amelyek bizonyos sejtípusokban korlátozottan működnek. Ezért a genom editálás ezekben a sejtekben várhatóan alacsony hatékonysággal lesz működőképes. Mindemellett a nukleázok közvetítette génmódosítás természetéből adódóan jelentős *off-target* hatással bír, nem kívánt DSB-ket indukálva a genomban, amely jelentősebb kárt okozhat, mint az inzerciós mutagenézis. Az exogén donorról biztosított transzpozíció nem indukál DSB-ket a genomban, és az inzerciós mutagenézis lehetősége előbb-utóbb kiküszöbölhető lesz az irányított transzpozázok alkalmazásával. A transzpozonok várhatóan még sokáig hatékony eszközt fognak biztosítani a genetikai manipulációk területén.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A DNS transzpozon alapú génbeviteli eljárások a hiperaktív variánsok fejlesztésének köszönhetően hatékony alternatívái a virális rendszereknek, melyek tumorigenikus potenciáljuk miatt jelenleg visszaszorulóban vannak a génterápia területén. A transzpozonok felhasználásának előfeltétele a különböző sejteken történő karakterizálás, emellett hatékonyságukat a DNS transzpozonokra jellemző, a transzpozáz dózistól függő túltermeléses gátlás (OPI) jelensége csökkentheti. Célunk a DNS transzpozonnal történő génbevétel sejtszintű vizsgálata és optimalizálása volt. Ennek érdekében a génbevételben megfigyelhető transzpozáz aktivitás (transzpozon donor kivágódás) monitorozására, valamint a végeredményként elért kópiaszámok megbízható mérésére alkalmas esszéket dolgoztunk ki, vizsgáltuk továbbá a transzgenikus sejtek számát. Háromféle sejt típuson végeztünk különféle kondíciók mellett génbeviteli kísérleteket a két leghatékonyabb *Sleeping Beauty* (SB) és *piggyBac* (PB) rendszerekkel.

Az OPI jelensége kizárólag a PB rendszerek esetén volt tetten érhető, mely a jó hatékonyságú transzfekciós módszerek ellenére csak kis mértékben jelentkezett extrém transzpozáz dózis esetén. Az irodalmi adatokkal ellentétben az SB100X túladagolhatóságát nem tapasztaltuk, mindazonáltal a transzgenikus sejtszámokban telítődés jelentkezett. Vizsgálataink sejt típusától függő eltéréseket mutattak. Valamennyi transzpozáz aktivitására a HEK-293 sejt vonal a leginkább permisszív, ennek ellenére több HeLa sejt tehető transzgenikussá, és az aktivitás egy nagyságrenddel alacsonyabb az embrionális őssejtekben. HeLa és HEK-293 sejtekben az mPB aktivitása jóval gyengébb az SB100X-hoz képest, míg embrionális őssejtekben a két rendszer hasonlóan jól alkalmazható. A hiperaktív PB (hyPB) rendelkezik a legjelentősebb kivágási aktivitással minden sejtben, ám nem eredményez több transzgenikus sejtet, mint az mPB. Ennek ellenére őssejteken kedvezőbben alkalmazható, amely sejtek úgy tűnik, permisszívebbek a PB számára. Jelentős az eltérés az elérhető átlagos kópiaszámokban, mely az SB esetén egészen magas (akár 40 kópia/sejt), míg a PB esetén csak néhány kópia. A kópiaszám csökkentésének hatékony módja a szubsztrát limitációja, amely kielégítő transzgenikus hatékonyságot biztosít a hiperaktív variánsok magas dózisú alkalmazásakor. A transzgenikus hatékonyságok, mind a sejtek száma, mind a kópiaszám tekintetében sok esetben nem korreláltak a kivágási aktivitással. Nem minden kivágást követ integráció, tehát ezek a lépések minden bizonnyal kinetikusan (akár térben és időben is) elkülönülnek egymástól.

Mindemellett karakterizáltuk az SB integrációs helyeit, melyek speciális DNS struktúrájú célhelyek preferenciáját mutatják. Továbbá a transzgenben alkalmazott különböző promóterek génbeviteli és génmegtartási dinamikára gyakorolt eltérő hatását figyeltük meg. Eredményeink alapján a génbevétel óvatos tervezése/optimalizálása javasolt minden egyes applikáció esetén.

8. SUMMARY

Development of hyperactive variants makes DNA transposons effective alternatives to viruses in gene therapy, whose tumorigenic potential has made them unfavorable in the field. Characterization as a tool for different cell types is a prerequisite for application of DNA transposons in therapy, moreover their efficiency could be lost with high dose of transposase by the overproduction inhibition phenomenon (OPI). The aim of our study was the cellular examination and optimization of gene delivery with DNA transposons. Therefore we have developed assays for monitoring the transposase activity (excision of transposon donor) during cellular gene delivery, and for reliable measuring of the resulting copy numbers. In addition, transgenic cell numbers were also determined. Different gene delivery conditions were tested in three types of cells with the most efficient *Sleeping Beauty* (SB) and *piggyBac* (PB) systems.

Phenomenon of OPI was observed exclusively in the case of PB systems, and despite the good transfection efficiency, it was detected only in a small extent, when extreme transposase doses were applied. Contrary to the literature data, SB100X could not be overdosed, although transgenic cell numbers were saturated with raising transposase amount. Our results pointed out cell type dependent differences. HEK-293 cell was proved to be the most permissive for all of the transposase variant activities, nonetheless more HeLa cells could become transgenic, and activities were an order of magnitude lower in embryonic stem cells. Activity of mPB was much lower than SB100X in HeLa and in HEK-293 cells, while in embryonic stem cells the two systems can be applied with comparable efficiency. Hyperactive PB (hyPB) has the highest excision activity in all cell types, however does not produce more transgenic cells than the mPB. Nevertheless, the PB system is favourably applicable in embryonic stem cells, which cells seem to be more permissive for the PB systems. Significant difference is seen in achievable copy numbers, as PB integrates only few copies, whereas SB could produce very high numbers (even 40 copies/cell). Substrate limitation is an efficient strategy to lower the copy number, which results in sufficient transgenic cells when high dose of hyperactive variants are applied. Transgenic efficiencies, with respect to either cell numbers, or copy numbers were not correlated with excision activities. Not all excision is followed by integration, so these steps are certainly separated from each other kinetically (even spatially and temporarily).

We have also characterised few integration sites of SB, which show remarkable preference for target sequences with special DNA structure. In addition, different transgene promoters affected gene transfer and persistence of expression differently. Our results indicate, that careful design and optimisation is recommended for all application of DNA transposon systems.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Orbán Tamásnak, hogy lehetővé tette az ELTE BDI Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Programjában való részvételemet, és hogy szakmai útmutatásaival jelentős részt vállalt közös munkánkban és publikációinkban.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Sarkadi Balázsnak a Biomembrán kutatócsoport vezetőjének, aki az intézetünket ért viszontagságok közepette is mindvégig biztosítani tudta munkánkhoz a megfelelő háttérrel.

Köszönet illeti Dr. Apáti Ágotát, az Embrionális Össejt labor vezetőjét, amiért lehetővé tette és segítette a humán őssejtekkel végzett munkánkat.

Hálás köszönet Erdei Zsuzsának, aki nélkül az őssejtes kísérletek nem valósultak volna meg.

Szeretném megköszönni Dr. Várady Györgynek a FACS-os mérésekben nyújtott segítségét és a sejtes szortolások elvégzését.

Köszönöm továbbá Sándor Sárának, aki bekapcsolódott munkánkba, és szakdolgozatával TDK helyezést ért el.

Szeretném megköszönni csoportunk többi tagjának támogatását. Köszönet Schamberger Anitának, akihez bármilyen kérdéssel fordulhattam, és Hupcsik Kornéliának, aki laborunk rendjét tartja fenn és háttérmunkákat végez. Köszönet a közvetlen környezetemben dolgozó kedves kollégáknak a baráti légkörért és a sok szép közös pillanatért.

Szeretném továbbá megköszönni tágabb csoportunk valamennyi tagjának, hogy a munkabeszámolókon keresztül ösztönözték a munkámat, vagy egy-egy mosollyal támogattak.

Nem utolsó sorban nagyon köszönöm páromnak Lerner Balázsnak, hogy mellettem volt és szeretetével biztatott.

Legvégül szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik esetleg nem kerültek név szerint említésre, mégis szakmailag vagy barátként támogattak – az intézetünkön belül vagy kívül – az elmúlt években.

Kutatásainkat az OTKA K112112 és a KMR_12-1-2012-0112 (TransRat) pályázatok támogatták.

10. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

10.1. Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

Kolacsek O, Erdei Z, Apáti A, Sándor S, Izsvák Z, Ivics Z, Sarkadi B, Orbán TI: Excision efficiency is not strongly coupled to transgenic rate: cell type-dependent transposition efficiency of Sleeping Beauty and piggyBac DNA transposons. *Hum Gene Ther Methods*. 2014, 25(4):241-52. IF: 2,44

Kolacsek O, Izsvák Z, Ivics Z, Sarkadi B, Orbán TI: Quantitative analysis of DNA transposon-mediated gene delivery: the Sleeping Beauty system as an example. In: *Genomics III - Methods, Techniques and Applications*, iConcept Press Ltd Book, ISBN: 978-1-922227-096, 2014, 97-123.

Kolacsek O, Krízsik V, Schamberger A, Erdei Z, Apáti A, Várady G, Mátés L, Izsvák Z, Ivics Z, Sarkadi B, Orbán TI: Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers. *Mob DNA*. 2011, 2(1):5. IF: 2,43

10.2. Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények

Kolacsek O, Pergel E, Varga N, Apáti Á, Orbán TI: Ct shift: A novel and accurate real-time PCR quantification model for direct comparison of different nucleic acid sequences and its application for transposon quantifications. *Gene*. (elfogadva) IF: 2,32

Jemnitz K, Bártai-Konczos A, Szabó M, Ioja E, Kolacsek O, Orbán TI, Török G, Homolya L, Kovács E, Jablonkai I, Veres Z: A transgenic rat hepatocyte - Kupffer cell co-culture model for evaluation of direct and macrophage-related effect of poly(amidoamine) dendrimers. *Toxicol In Vitro*. (elfogadva) IF: 3,34

Szebényi K, Füredi A, Kolacsek O, Pergel E, Bősze Z, Bender B, Vajdovich P, Tóvári J, Homolya L, Szakács G, Héja L, Enyedi Á, Sarkadi B, Apáti Á, Orbán TI: Generation of a Homozygous Transgenic Rat Strain Stably Expressing a Calcium Sensor Protein for Direct Examination of Calcium Signaling. *Sci Rep*. 2015, 5:12645. IF: 5,23

Szebényi K, Füredi A, Kolacsek O, Csohány R, Prókai Á, Kis-Petik K, Szabó A, Bősze Z, Bender B, Tóvári J, Enyedi Á, Orbán TI, Apáti Á, Sarkadi B: Visualization of Calcium Dynamics in Kidney Proximal Tubules. *J Am Soc Nephrol*. 2015, 26(11):2731-40. IF: 8,49

Apáti Á, Pásztty K, Hegedüs L, Kolacsek O, Orbán TI, Erdei Z, Szebényi K, Péntek A, Enyedi Á, Sarkadi B: Characterization of calcium signals in human embryonic stem cells and in their differentiated offspring by a stably integrated calcium indicator protein. *Cell Signal*. 2013, 25(4):752-9. IF: 4,47

Kámory E, Tanyi M, Kolacsek O, Olasz L, Tóth L, Damjanovich L, Csuka O: Two germline alterations in mismatch repair genes found in a HNPCC patient with poor family history. *Pathol Oncol Res*. 2006, 12(4):228-33. IF: 1,24

Kámory E, Kolacsek O, Ottó S, Csuka O: hMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res*. 2003, 9(4):236-41. IF: 1,16

11. IRODALOMJEGYZÉK

- 1 Lohe, A. R., Moriyama, E. N., Lidholm, D. A., Hartl, D. L., Horizontal transmission, vertical inactivation, and stochastic loss of mariner-like transposable elements. *Molecular biology and evolution* 1995, *12*, 62-72.
- 2 Hartl, D. L., Lohe, A. R., Lozovskaya, E. R., Modern thoughts on an ancient mariner: function, evolution, regulation. *Annual review of genetics* 1997, *31*, 337-358.
- 3 Zimmer, E. A., Martin, S. L., Beverley, S. M., Kan, Y. W., Wilson, A. C., Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980, *77*, 2158-2162.
- 4 Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., *et al.*, Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 1999, *151*, 1531-1545.
- 5 Hastings, P. J., Lupski, J. R., Rosenberg, S. M., Ira, G., Mechanisms of change in gene copy number. *Nature reviews. Genetics* 2009, *10*, 551-564.
- 6 Lupski, J. R., Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 1998, *14*, 417-422.
- 7 Gebert, D., Rosenkranz, D., RNA-based regulation of transposon expression. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 2015, *6*, 687-708.
- 8 Bao, J., Yan, W., Male germline control of transposable elements. *Biology of reproduction* 2012, *86*, 162, 161-114.
- 9 Garcia-Perez, J. L., Marchetto, M. C., Muotri, A. R., Coufal, N. G., *et al.*, LINE-1 retrotransposition in human embryonic stem cells. *Human molecular genetics* 2007, *16*, 1569-1577.
- 10 Coufal, N. G., Garcia-Perez, J. L., Peng, G. E., Yeo, G. W., *et al.*, L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* 2009, *460*, 1127-1131.
- 11 Upton, K. R., Gerhardt, D. J., Jesuadian, J. S., Richardson, S. R., *et al.*, Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell* 2015, *161*, 228-239.
- 12 Huang, C. R., Burns, K. H., Boeke, J. D., Active transposition in genomes. *Annual review of genetics* 2012, *46*, 651-675.
- 13 Bradshaw, V. A., McEntee, K., DNA damage activates transcription and transposition of yeast Ty retrotransposons. *Molecular & general genetics : MGG* 1989, *218*, 465-474.
- 14 Khurana, J. S., Wang, J., Xu, J., Koppetsch, B. S., *et al.*, Adaptation to P element transposon invasion in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 2011, *147*, 1551-1563.
- 15 Sahu, P. P., Pandey, G., Sharma, N., Puranik, S., *et al.*, Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant cell reports* 2013, *32*, 1151-1159.
- 16 Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., *et al.*, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, *409*, 860-921.
- 17 Fugmann, S. D., The origins of the Rag genes--from transposition to V(D)J recombination. *Seminars in immunology* 2010, *22*, 10-16.
- 18 Greider, C. W., Telomere length regulation. *Annual review of biochemistry* 1996, *65*, 337-365.
- 19 Pardue, M. L., DeBaryshe, P. G., Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annual review of genetics* 2003, *37*, 485-511.
- 20 Sinzelle, L., Izsvak, Z., Ivics, Z., Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2009, *66*, 1073-1093.

- 21 Dupuy, A. J., Current applications of transposons in mouse genetics. *Methods in enzymology* 2010, 477, 53-70.
- 22 DeNicola, G. M., Karreth, F. A., Adams, D. J., Wong, C. C., The utility of transposon mutagenesis for cancer studies in the era of genome editing. *Genome biology* 2015, 16, 229.
- 23 Di Matteo, M., Belay, E., Chuah, M. K., Vandendriessche, T., Recent developments in transposon-mediated gene therapy. *Expert opinion on biological therapy* 2012, 12, 841-858.
- 24 Pritham, E. J., Feschotte, C., Massive amplification of rolling-circle transposons in the lineage of the bat *Myotis lucifugus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104, 1895-1900.
- 25 Curcio, M. J., Derbyshire, K. M., The outs and ins of transposition: From mu to kangaroo. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2003, 4, 865-877.
- 26 Kulkosky, J., Jones, K. S., Katz, R. A., Mack, J. P. G., Skalka, A. M., Residues Critical for Retroviral Integrative Recombination in a Region That Is Highly Conserved among Retroviral Retrotransposon Integrases and Bacterial Insertion-Sequence Transposases. *Mol Cell Biol* 1992, 12, 2331-2338.
- 27 Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., Guedon, G., Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* 2002, 46, 601-610.
- 28 Kapitonov, V. V., Jurka, J., Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. *Trends Genet* 2007, 23, 521-529.
- 29 Newman, J. C., Bailey, A. D., Fan, H. Y., Pavelitz, T., Weiner, A. M., An abundant evolutionarily conserved CSB-PiggyBac fusion protein expressed in Cockayne syndrome. *PLoS genetics* 2008, 4, e1000031.
- 30 Garfinkel, D. J., Boeke, J. D., Fink, G. R., Ty element transposition: reverse transcriptase and virus-like particles. *Cell* 1985, 42, 507-517.
- 31 Ostertag, E. M., Kazazian, H. H., Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annual review of genetics* 2001, 35, 501-538.
- 32 Cohen, C. J., Lock, W. M., Mager, D. L., Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: A critical assessment. *Gene* 2009, 448, 105-114.
- 33 Eichinger, D. J., Boeke, J. D., A Specific Terminal Structure Is Required for Ty1 Transposition. *Gene Dev* 1990, 4, 324-330.
- 34 Cappello, J., Handelsman, K., Lodish, H. F., Sequence of Dictyostelium DIRS-1: an apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence. *Cell* 1985, 43, 105-115.
- 35 Shi, X., Seluanov, A., Gorbunova, V., Cell divisions are required for L1 retrotransposition. *Mol Cell Biol* 2007, 27, 1264-1270.
- 36 Luan, D. D., Korman, M. H., Jakubczak, J. L., Eickbush, T. H., Reverse Transcription of R2bm Rna Is Primed by a Nick at the Chromosomal Target Site - a Mechanism for Non-Ltr Retrotransposition. *Cell* 1993, 72, 595-605.
- 37 Han, J. S., Szak, S. T., Boeke, J. D., Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* 2004, 429, 268-274.
- 38 Pickeral, O. K., Makalowski, W., Boguski, M. S., Boeke, J. D., Frequent human genomic DNA transduction driven by LINE-1 retrotransposition. *Genome Res* 2000, 10, 411-415.
- 39 Kitts, P. A., Nash, H. A., Homology-dependent interactions in phage lambda site-specific recombination. *Nature* 1987, 329, 346-348.
- 40 Zhang, J., Zhao, J., Jiang, W. J., Shan, X. W., *et al.*, Conditional gene manipulation: Creating a new biological era. *J Zhejiang Univ-Sc B* 2012, 13, 511-524.

- 41 Kapitonov, V. V., Jurka, J., Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, 98, 8714-8719.
- 42 Mendiola, M. V., Bernales, I., de la Cruz, F., Differential roles of the transposon termini in IS91 transposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, 91, 1922-1926.
- 43 Hanai, R., Wang, J. C., The Mechanism of Sequence-Specific DNA Cleavage and Strand Transfer by Phi-X174 Gene-a-Asterisk Protein. *J Biol Chem* 1993, 268, 23830-23836.
- 44 Garcillan-Barcia, M. D., Bernales, I., Mendiola, M. V., de la Cruz, F., Single-stranded DNA intermediates in IS91 rolling-circle transposition. *Mol Microbiol* 2001, 39, 494-501.
- 45 Grabundzija, I., Messing, S. A., Thomas, J., Cosby, R. L., *et al.*, A Helitron transposon reconstructed from bats reveals a novel mechanism of genome shuffling in eukaryotes. *Nat Commun* 2016, 7.
- 46 Morgante, M., Brunner, S., Pea, G., Fengler, K., *et al.*, Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. *Nat Genet* 2005, 37, 997-1002.
- 47 Thomas, J., Phillips, C. D., Baker, R. J., Pritham, E. J., Rolling-Circle Transposons Catalyze Genomic Innovation in a Mammalian Lineage. *Genome Biol Evol* 2014, 6, 2595-2610.
- 48 Mc, C. B., The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1950, 36, 344-355.
- 49 Haren, L., Ton-Hoang, B., Chandler, M., Integrating DNA: Transposases and retroviral integrases. *Annu Rev Microbiol* 1999, 53, 245-281.
- 50 Dyda, F., Hickman, A. B., Jenkins, T. M., Engelman, A., *et al.*, Crystal-Structure of the Catalytic Domain of Hiv-1 Integrase - Similarity to Other Polynucleotidyl Transferases. *Science* 1994, 266, 1981-1986.
- 51 Davies, D. R., Goryshin, I. Y., Reznikoff, W. S., Rayment, I., Three-dimensional structure of the Tn5 synaptic complex transposition intermediate. *Science* 2000, 289, 77-85.
- 52 Bujacz, G., Alexandratos, J., Wlodawer, A., Binding of different divalent cations to the active site of avian sarcoma virus integrase and their effects on enzymatic activity. *J Biol Chem* 1997, 272, 18161-18168.
- 53 Lovell, S., Goryshin, I. Y., Reznikoff, W. R., Rayment, I., Two-metal active site binding of a Tn5 transposase synaptic complex. *Nat Struct Biol* 2002, 9, 278-281.
- 54 Katayanagi, K., Miyagawa, M., Matsushima, M., Ishikawa, M., *et al.*, Three-dimensional structure of ribonuclease H from *E. coli*. *Nature* 1990, 347, 306-309.
- 55 Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Ghirlando, R., Cerritelli, S. M., *et al.*, Structure of human RNase H1 complexed with an RNA/DNA hybrid: Insight into HIV reverse transcription (vol 28, pg 264, 2007). *Mol Cell* 2007, 28, 513-513.
- 56 Capy, P., Langin, T., Higuete, D., Maurer, P., Bazin, C., Do the integrases of LTR-retrotransposons and class II element transposases have a common ancestor? *Genetica* 1997, 100, 63-72.
- 57 Ivics, Z., Izsvak, Z., Minter, A., Hackett, P. B., Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93, 5008-5013.
- 58 Munoz-Lopez, M., Garcia-Perez, J. L., DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Curr Genomics* 2010, 11, 115-128.
- 59 Tosi, L. R. O., Beverley, S. M., cis and trans factors affecting Mos1 mariner evolution and transposition in vitro, and its potential for functional genomics. *Nucleic Acids Res* 2000, 28, 784-790.

- 60 Karsi, A., Moav, B., Hackett, P., Liu, Z. J., Effects of insert size on transposition efficiency of the Sleeping Beauty transposon in mouse cells. *Mar Biotechnol* 2001, 3, 241-245.
- 61 Lampe, D. J., Grant, T. E., Robertson, H. M., Factors affecting transposition of the Himar1 mariner transposon in vitro. *Genetics* 1998, 149, 179-187.
- 62 Ding, S., Wu, X. H., Li, G., Han, M., *et al.*, Efficient transposition of the piggyBac resource (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* 2005, 122, 473-483.
- 63 Chandler, M., Clerget, M., Galas, D. J., The Transposition Frequency of Is1-Flanked Transposons Is a Function of Their Size. *J Mol Biol* 1982, 154, 229-243.
- 64 Bhasin, A., Goryshin, I. Y., Reznikoff, W. S., Hairpin formation in Tn5 transposition. *J Biol Chem* 1999, 274, 37021-37029.
- 65 Kennedy, A. K., Guhathakurta, A., Kleckner, N., Haniford, D. B., Tn10 transposition via a DNA hairpin intermediate. *Cell* 1998, 95, 125-134.
- 66 Mitra, R., Fain-Thornton, J., Craig, N. L., piggyBac can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition. *Embo Journal* 2008, 27, 1097-1109.
- 67 Zhou, L. Q., Mitra, R., Atkinson, P. W., Hickman, A. B., *et al.*, Transposition of hAT elements links transposable elements and V(D)J recombination. *Nature* 2004, 432, 995-1001.
- 68 Dawson, A., Finnegan, D. J., Excision of the *Drosophila* mariner transposon Mos1: Comparison with bacterial transposition and V(D)J recombination. *Mol Cell* 2003, 11, 225-235.
- 69 Bouuaert, C. C., Walker, N., Liu, D. X., Chalmers, R., Crosstalk between transposase subunits during cleavage of the mariner transposon. *Nucleic Acids Res* 2014, 42, 5799-5808.
- 70 Bouuaert, C. C., Chalmers, R., Transposition of the human Hsmar1 transposon: rate-limiting steps and the importance of the flanking TA dinucleotide in second strand cleavage. *Nucleic Acids Res* 2010, 38, 190-202.
- 71 Vos, J. C., DeBaere, I., Plasterk, R. H. A., Transposase is the only nematode protein required for in vitro transposition of Tc1. *Gene Dev* 1996, 10, 755-761.
- 72 Lampe, D. J., Churchill, M. E. A., Robertson, H. M., A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition in vitro (vol 15, pg 5470, 1996). *Embo Journal* 1997, 16, 4153-4153.
- 73 Tellier, M., Bouuaert, C. C., Chalmers, R., Mariner and the ITm Superfamily of Transposons. *Microbiol Spectr* 2015, 3.
- 74 Colloms, S. D., Vanluenen, H. G. A. M., Plasterk, R. H. A., DNA-Binding Activities of the *Caenorhabditis-Elegans* Tc3 Transposase. *Nucleic Acids Res* 1994, 22, 5548-5554.
- 75 Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H., Izsvak, Z., Molecular reconstruction of Sleeping beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 1997, 91, 501-510.
- 76 Izsvak, Z., Ivics, Z., Plasterk, R. H., Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol* 2000, 302, 93-102.
- 77 Sarnovsky, R. J., May, E. W., Craig, N. L., The Tn7 transposase is a heteromeric complex in which DNA breakage and joining activities are distributed between different gene products. *Embo Journal* 1996, 15, 6348-6361.
- 78 Craigie, R., Mizuuchi, K., Mechanism of transposition of bacteriophage Mu: structure of a transposition intermediate. *Cell* 1985, 41, 867-876.
- 79 Lewis, L. A., Grindley, N. D., Two abundant intramolecular transposition products, resulting from reactions initiated at a single end, suggest that IS2 transposes by an unconventional pathway. *Mol Microbiol* 1997, 25, 517-529.

- 80 Kapitonov, V. V., Jurka, J., Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, *103*, 4540-4545.
- 81 Pritham, E. J., Putliwala, T., Feschotte, C., Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene* 2007, *390*, 3-17.
- 82 Haapa-Paananen, S., Wahlberg, N., Savilahti, H., Phylogenetic analysis of Maverick/Polinton giant transposons across organisms. *Mol Phylogenet Evol* 2014, *78*, 271-274.
- 83 Anand, R. P., Lovett, S. T., Haber, J. E., Break-Induced DNA Replication. *Csh Perspect Biol* 2013, *5*.
- 84 Chalmers, R. M., Kleckner, N., IS10 Tn10 transposition efficiently accommodates diverse transposon end configurations. *Embo Journal* 1996, *15*, 5112-5122.
- 85 Zhang, J. B., Zuo, T., Peterson, T., Generation of Tandem Direct Duplications by Reversed-Ends Transposition of Maize Ac Elements. *PLoS genetics* 2013, *9*.
- 86 English, J. J., Harrison, K., Jones, J. D. G., Aberrant Transpositions of Maize Double Ds-Like Elements Usually Involve Ds Ends on Sister Chromatids. *Plant Cell* 1995, *7*, 1235-1247.
- 87 Gray, Y. H. M., It takes two transposons to tango - transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet* 2000, *16*, 461-468.
- 88 Wang, Y. M., Wang, J. C., Devaraj, A., Singh, M., *et al.*, Suicidal Autointegration of Sleeping Beauty and piggyBac Transposons in Eukaryotic Cells. *PLoS genetics* 2014, *10*.
- 89 Bouuaert, C. C., Liu, D. X., Chalmers, R., A Simple Topological Filter in a Eukaryotic Transposon as a Mechanism To Suppress Genome Instability. *Mol Cell Biol* 2011, *31*, 317-327.
- 90 Izsvak, Z., Stuwe, E. E., Fiedler, D., Katzer, A., *et al.*, Healing the wounds inflicted by Sleeping Beauty transposition by double-strand break repair in mammalian somatic cells. *Mol Cell* 2004, *13*, 279-290.
- 91 Abrusan, G., Krambeck, H. J., Competition may determine the diversity of transposable elements. *Theor Popul Biol* 2006, *70*, 364-375.
- 92 Kidwell, M. G., Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 2002, *115*, 49-63.
- 93 Boulesteix, M., Weiss, M., Biemont, C., Differences in genome size between closely related species: The *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Molecular biology and evolution* 2006, *23*, 162-167.
- 94 Piegu, B., Guyot, R., Picault, N., Roulin, A., *et al.*, Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Res* 2006, *16*, 1262-1269.
- 95 SanMiguel, P., Gaut, B. S., Tikhonov, A., Nakajima, Y., Bennetzen, J. L., The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat Genet* 1998, *20*, 43-45.
- 96 McCarthy, E. M., McDonald, J. F., Long terminal repeat retrotransposons of *Mus musculus*. *Genome biology* 2004, *5*.
- 97 Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., *et al.*, Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 2007, *315*, 207-212.
- 98 Feschotte, C., Pritham, E. J., DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual review of genetics* 2007, *41*, 331-368.
- 99 Bakre, A. A., Rawal, K., Ramaswamy, R., Bhattacharya, A., Bhattacharya, S., The LINES and SINES of *Entamoeba histolytica*: Comparative analysis and genomic distribution. *Exp Parasitol* 2005, *110*, 207-213.

- 100 Pritham, E. J., Feschotte, C., Wessler, S. R., Unexpected diversity and differential success of DNA transposons in four species of *Entamoeba* protozoans. *Molecular biology and evolution* 2005, 22, 1751-1763.
- 101 Pace, J. K., Feschotte, C., The evolutionary history of human DNA transposons: Evidence for intense activity in the primate lineage. *Genome Res* 2007, 17, 422-432.
- 102 Ray, D. A., Pagan, H. J. T., Thompson, M. L., Stevens, R. D., Bats with hATs: Evidence for recent DNA transposon activity in genus *Myotis*. *Molecular biology and evolution* 2007, 24, 632-639.
- 103 Engels, W. R., Johnsonschlitz, D. M., Eggleston, W. B., Sved, J., High-Frequency P-Element Loss in *Drosophila* Is Homolog Dependent. *Cell* 1990, 62, 515-525.
- 104 Ros, F., Kunze, R., Regulation of activator/dissociation transposition by replication and DNA methylation. *Genetics* 2001, 157, 1723-1733.
- 105 Bouuaert, C. C., Lipkow, K., Andrews, S. S., Liu, D. X., Chalmers, R., The autoregulation of a eukaryotic DNA transposon. *Elife* 2013, 2.
- 106 Lohe, A. R., Hartl, D. L., Autoregulation of mariner transposase activity by overproduction and dominant-negative complementation. *Molecular biology and evolution* 1996, 13, 549-555.
- 107 Lohe, A. R., DeAguiar, D., Hartl, D. L., Mutations in the mariner transposase: The D,D(35)E consensus sequence is nonfunctional. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94, 1293-1297.
- 108 Hsia, A. P., Schnable, P. S., DNA sequence analyses support the role of interrupted gap repair in the origin of internal deletions of the maize transposon, MuDR. *Genetics* 1996, 142, 603-618.
- 109 Rubin, E., Levy, A. A., Abortive gap repair: Underlying mechanism for Ds element formation. *Mol Cell Biol* 1997, 17, 6294-6302.
- 110 Feschotte, C., Jiang, N., Wessler, S. R., Plant transposable elements: Where genetics meets genomics. *Nature Reviews Genetics* 2002, 3, 329-341.
- 111 Hartl, D. L., Lozovskaya, E. R., Lawrence, J. G., Nonautonomous Transposable Elements in Prokaryotes and Eukaryotes. *Genetica* 1992, 86, 47-53.
- 112 Sijen, T., Plasterk, R. H. A., Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* 2003, 426, 310-314.
- 113 Slotkin, R. K., Freeling, M., Lisch, D., Heritable transposon silencing initiated by a naturally occurring transposon inverted duplication. *Nat Genet* 2005, 37, 641-644.
- 114 Houck, M. A., Clark, J. B., Peterson, K. R., Kidwell, M. G., Possible Horizontal Transfer of *Drosophila* Genes by the Mite *Proctolaelaps-Regalis*. *Science* 1991, 253, 1125-1129.
- 115 Walisko, O., Izsvak, Z., Szabo, K., Kaufmann, C. D., *et al.*, Sleeping Beauty transposase modulates cell-cycle progression through interaction with Miz-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103, 4062-4067.
- 116 Miskey, C., Izsvak, Z., Kawakami, K., Ivics, Z., DNA transposons in vertebrate functional genomics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005, 62, 629-641.
- 117 O'Brochta, D. A., Atkinson, P. W., Transformation systems in insects. *Methods in molecular biology* 2004, 260, 227-254.
- 118 Casse, N., Bui, Q. T., Nicolas, V., Renault, S., *et al.*, Species sympatry and horizontal transfers of Mariner transposons in marine crustacean genomes. *Mol Phylogenet Evol* 2006, 40, 609-619.
- 119 Robertson, H. M., Lampe, D. J., Recent Horizontal Transfer of a Mariner Transposable Element among and between Diptera and Neuroptera. *Molecular biology and evolution* 1995, 12, 850-862.

- 120 Laha, T., Loukas, A., Wattanasatitarpa, S., Somprakhon, J., *et al.*, The bandit, a New DNA Transposon from a Hookworm-Possible Horizontal Genetic Transfer between Host and Parasite. *Plos Neglect Trop D* 2007, *1*.
- 121 Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., *et al.*, The tree of eukaryotes. *Trends Ecol Evol* 2005, *20*, 670-676.
- 122 Feschotte, C., Wessler, S. R., Mariner-like transposases are widespread and diverse in flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, *99*, 280-285.
- 123 Heslip, T. R., Williams, J. A., Bell, J. B., Hodgetts, R. B., A P-Element Chimera Containing Captured Genomic Sequences Was Recovered at the Vestigial Locus in *Drosophila* Following Targeted Transposition. *Genetics* 1992, *131*, 917-927.
- 124 Nassif, N., Penney, J., Pal, S., Engels, W. R., Gloor, G. B., Efficient Copying of Nonhomologous Sequences from Ectopic Sites Via P-Element-Induced Gap Repair. *Mol Cell Biol* 1994, *14*, 1613-1625.
- 125 Lampe, D. J., Walden, K. K. O., Robertson, H. M., Loss of transposase-DNA interaction may underlie the divergence of mariner family transposable elements and the ability of more than one mariner to occupy the same genome. *Molecular biology and evolution* 2001, *18*, 954-961.
- 126 Loot, C., Santiago, N., Sanz, A., Casacuberta, J. M., The proteins encoded by the pogo-like Lem1 element bind the TIRs and subterminal repeated motifs of the Arabidopsis Emigrant MITE: consequences for the transposition mechanism of MITEs. *Nucleic Acids Res* 2006, *34*, 5238-5246.
- 127 Levitt, A., Emmons, S. W., The Tc2 Transposon in *Caenorhabditis-Elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, *86*, 3232-3236.
- 128 Calvi, B. R., Gelbart, W. M., The Basis for Germline Specificity of the Hobo Transposable Element in *Drosophila-Melanogaster*. *Embo Journal* 1994, *13*, 1636-1644.
- 129 Kelleher, E. S., Barbash, D. A., Analysis of piRNA-Mediated Silencing of Active TEs in *Drosophila melanogaster* Suggests Limits on the Evolution of Host Genome Defense. *Molecular biology and evolution* 2013, *30*, 1816-1829.
- 130 Pimpinelli, S., Berloco, M., Fanti, L., Dimitri, P., *et al.*, Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, *92*, 3804-3808.
- 131 Ikeda, R., Kokubu, C., Yusa, K., Keng, V. W., *et al.*, Sleeping Beauty transposase has an affinity for heterochromatin conformation. *Mol Cell Biol* 2007, *27*, 1665-1676.
- 132 Chalmers, R. M., Kleckner, N., Tn10/Is10 Transposase Purification, Activation, and in-Vitro Reaction. *J Biol Chem* 1994, *269*, 8029-8035.
- 133 Miskey, C., Papp, B., Mates, L., Sinzelle, L., *et al.*, The ancient mariner sails again: Transposition of the human Hsmar1 element by a reconstructed transposase and activities of the SETMAR protein on transposon ends. *Mol Cell Biol* 2007, *27*, 4589-4600.
- 134 Emmons, S. W., Yesner, L., Ruan, K. S., Katzenberg, D., Evidence for a Transposon in *Caenorhabditis Elegans*. *Cell* 1983, *32*, 55-65.
- 135 Collins, J., Forbes, E., Anderson, P., The Tc3 Family of Transposable Genetic Elements in *Caenorhabditis-Elegans*. *Genetics* 1989, *121*, 47-55.
- 136 Liao, L. W., Rosenzweig, B., Hirsh, D., Analysis of a Transposable Element in *Caenorhabditis-Elegans*. *P Natl Acad Sci-Biol* 1983, *80*, 3585-3589.
- 137 Egilmez, N. K., Ebert, R. H., Reis, R. J. S., Strain Evolution in *Caenorhabditis-Elegans* - Transposable Elements as Markers of Interstrain Evolutionary History. *J Mol Evol* 1995, *40*, 372-381.

- 138 Lin, F. L., Sperle, K., Sternberg, N., Model for Homologous Recombination during Transfer of DNA into Mouse L-Cells - Role for DNA Ends in the Recombination Process. *Mol Cell Biol* 1984, *4*, 1020-1034.
- 139 Mehta, A., Haber, J. E., Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. *Csh Perspect Biol* 2014, *6*.
- 140 Zwaal, R. R., Broeks, A., van Meurs, J., Groenen, J. T., Plasterk, R. H., Target-selected gene inactivation in *Caenorhabditis elegans* by using a frozen transposon insertion mutant bank. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, *90*, 7431-7435.
- 141 Tsubota, S., Schedl, P., Hybrid Dysgenesis-Induced Revertants of Insertions at the 5' End of the Rudimentary Gene in *Drosophila-Melanogaster* - Transposon-Induced Control Mutations. *Genetics* 1986, *114*, 165-182.
- 142 Barrett, P. L., Fleming, J. T., Gobel, V., Targeted gene alteration in *Caenorhabditis elegans* by gene conversion. *Nat Genet* 2004, *36*, 1231-1237.
- 143 Gloor, G. B., Nassif, N. A., Johnsonschlitz, D. M., Preston, C. R., Engels, W. R., Targeted Gene Replacement in *Drosophila* Via P-Element-Induced Gap Repair. *Science* 1991, *253*, 1110-1117.
- 144 Bessereau, J. L., Wright, A., Williams, D. C., Schuske, K., *et al.*, Mobilization of a *Drosophila* transposon in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Nature* 2001, *413*, 70-74.
- 145 Bessereau, J. L., Insertional mutagenesis in *C. elegans* using the *Drosophila* transposon Mos1: a method for the rapid identification of mutated genes. *Methods in molecular biology* 2006, *351*, 59-73.
- 146 Williams, D. C., Boulin, T., Ruaud, A. F., Jorgensen, E. M., Bessereau, J. L., Characterization of Mos1-mediated mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*: A method for the rapid identification of mutated genes. *Genetics* 2005, *169*, 1779-1785.
- 147 Cooley, L., Kelley, R., Spradling, A., Insertional Mutagenesis of the *Drosophila* Genome with Single P-Elements. *Science* 1988, *239*, 1121-1128.
- 148 Kapetanaki, M. G., Loukeris, T. G., Livadaras, I., Savakis, C., High frequencies of Minos transposon mobilization are obtained in insects by using in vitro synthesized mRNA as a source of transposase. *Nucleic Acids Res* 2002, *30*, 3333-3340.
- 149 Rubin, G. M., Kidwell, M. G., Bingham, P. M., The Molecular-Basis of P-M Hybrid Dysgenesis - the Nature of Induced Mutations. *Cell* 1982, *29*, 987-994.
- 150 Bingham, P. M., Kidwell, M. G., Rubin, G. M., The Molecular-Basis of P-M Hybrid Dysgenesis - the Role of the P-Element, a P-Strain-Specific Transposon Family. *Cell* 1982, *29*, 995-1004.
- 151 Brennecke, J., Malone, C. D., Aravin, A. A., Sachidanandam, R., *et al.*, An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science* 2008, *322*, 1387-1392.
- 152 Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., *et al.*, A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* 2005, *11*, 1287-1289.
- 153 Mates, L., Izsvak, Z., Ivics, Z., Technology transfer from worms and flies to vertebrates: transposition-based genome manipulations and their future perspectives. *Genome biology* 2007, *8*.
- 154 Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G. C., He, Y. C., *et al.*, The BDGP gene disruption project: Single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* 2004, *167*, 761-781.
- 155 Franz, G., Savakis, C., Minos, a New Transposable Element from *Drosophila-Hydei*, Is a Member of the Tc1-Like Family of Transposons. *Nucleic Acids Res* 1991, *19*, 6646-6646.

- 156 Sundararajan, P., Atkinson, P. W., O'Brochta, D. A., Transposable element interactions in insects: crossmobilization of hobo and Hermes. *Insect Mol Biol* 1999, 8, 359-368.
- 157 Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., *et al.*, A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet* 2004, 36, 283-287.
- 158 Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., *et al.*, Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet* 2004, 36, 288-292.
- 159 Golic, K. G., Site-Specific Recombination between Homologous Chromosomes in *Drosophila*. *Science* 1991, 252, 958-961.
- 160 Kos, C. H., Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev* 2004, 62, 243-246.
- 161 Sauer, B., Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 1998, 14, 381-392.
- 162 Xin, H. B., Deng, K. Y., Shui, B., Qu, S., *et al.*, Gene trap and gene inversion methods for conditional gene inactivation in the mouse. *Nucleic Acids Res* 2005, 33, e14.
- 163 Justice, M. J., Noveroske, J. K., Weber, J. S., Zheng, B., Bradley, A., Mouse ENU mutagenesis. *Human molecular genetics* 1999, 8, 1955-1963.
- 164 Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W. B., *et al.*, A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Gene Dev* 1999, 13, 2713-2724.
- 165 Kimberland, M. L., Divoky, V., Prchal, J., Schwahn, U., *et al.*, Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Human molecular genetics* 1999, 8, 1557-1560.
- 166 Brouha, B., Meischl, C., Ostertag, E., de Boer, M., *et al.*, Evidence consistent with human L1 retrotransposition in maternal meiosis I. *Am J Hum Genet* 2002, 71, 327-336.
- 167 Han, J. S., Boeke, J. D., A highly active synthetic mammalian retrotransposon. *Nature* 2004, 429, 314-318.
- 168 Ostertag, E. M., DeBerardinis, R. J., Goodier, J. L., Zhang, Y., *et al.*, A mouse model of human L1 retrotransposition. *Nat Genet* 2002, 32, 655-660.
- 169 Prak, E. T., Dodson, A. W., Farkash, E. A., Kazazian, H. H., Jr., Tracking an embryonic L1 retrotransposition event. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100, 1832-1837.
- 170 An, W. F., Han, J. S., Wheelan, S. J., Davis, E. S., *et al.*, Active retrotransposition by a synthetic L1 element in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103, 18662-18667.
- 171 Kano, H., Godoy, I., Courtney, C., Vetter, M. R., *et al.*, L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. *Gene Dev* 2009, 23, 1303-1312.
- 172 Garcia-Perez, J. L., Morell, M., Scheys, J. O., Kulpa, D. A., *et al.*, Epigenetic silencing of engineered L1 retrotransposition events in human embryonic carcinoma cells. *Nature* 2010, 466, 769-773.
- 173 Muotri, A. R., Chu, V. T., Marchetto, M. C. N., Deng, W., *et al.*, Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 2005, 435, 903-910.
- 174 Cary, L. C., Goebel, M., Corsaro, B. G., Wang, H. G., *et al.*, Transposon Mutagenesis of Baculoviruses - Analysis of Trichoplusia-Ni Transposon Ifp2 Insertions within the Fp-Locus of Nuclear Polyhedrosis Viruses. *Virology* 1989, 172, 156-169.
- 175 Fraser, M. J., Cary, L., Boonvisudhi, K., Wang, H. G. H., Assay for Movement of Lepidopteran Transposon Ifp2 in Insect Cells Using a Baculovirus Genome as a Target DNA. *Virology* 1995, 211, 397-407.

- 176 Drabek, D., Zagoraiou, L., deWit, T., Langeveld, A., *et al.*, Transposition of the *Drosophila hydei* Minos transposon in the mouse germ line. *Genomics* 2003, *81*, 108-111.
- 177 Kawakami, K., Shima, A., Kawakami, N., Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, *97*, 11403-11408.
- 178 Balciunas, D., Wangensteen, K. J., Wilber, A., Bell, J., *et al.*, Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. *PLoS genetics* 2006, *2*, 1715-1724.
- 179 Parinov, S., Kondrichin, I., Korzh, V., Emelyanov, A., Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2004, *231*, 449-459.
- 180 Keng, V. W., Ryan, B. J., Wangensteen, K. J., Balciunas, D., *et al.*, Efficient Transposition of Tol2 in the Mouse Germline. *Genetics* 2009, *183*, 1565-1573.
- 181 Miskey, C., Izsvak, Z., Plasterk, R. H., Ivics, Z., The Frog Prince: a reconstructed transposon from *Rana pipiens* with high transpositional activity in vertebrate cells. *Nucleic Acids Res* 2003, *31*, 6873-6881.
- 182 Carlson, C. M., Dupuy, A., Fritz, S., Roberg-Perez, K., *et al.*, Transposon mutagenesis of the mouse germline. *Genetics* 2003, *165*, 243-256.
- 183 Dupuy, A. J., Clark, K., Carlson, C. M., Fritz, S., *et al.*, Mammalian germ-line transgenesis by transposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, *99*, 4495-4499.
- 184 Dupuy, A. J., Fritz, S., Largaespada, D. A., Transposition and gene disruption in the male germline of the mouse. *Genesis* 2001, *30*, 82-88.
- 185 Horie, K., Kuroiwa, A., Ikawa, M., Okabe, M., *et al.*, Efficient chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like transposon Sleeping Beauty in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, *98*, 9191-9196.
- 186 Horie, K., Yusa, K., Yae, K., Odajima, J., *et al.*, Characterization of Sleeping Beauty transposition and its application to genetic screening in mice. *Mol Cell Biol* 2003, *23*, 9189-9207.
- 187 Kitada, K., Ishishita, S., Tosaka, K., Takahashi, R. I., *et al.*, Transposon-tagged mutagenesis in the rat. *Nat Methods* 2007, *4*, 131-133.
- 188 Lu, B. S., Geurts, A. M., Poirier, C., Petit, D. C., *et al.*, Generation of rat mutants using a coat color-tagged Sleeping Beauty transposon system. *Mamm Genome* 2007, *18*, 338-346.
- 189 Wang, W., Lin, C. Y., Lu, D., Ning, Z. M., *et al.*, Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, *105*, 9290-9295.
- 190 Yusa, K., Zhou, L. Q., Li, M. A., Bradley, A., Craig, N. L., A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, *108*, 1531-1536.
- 191 Doherty, J. E., Huye, L. E., Yusa, K., Zhou, L. Q., *et al.*, Hyperactive piggyBac Gene Transfer in Human Cells and In Vivo. *Hum Gene Ther* 2012, *23*, 311-320.
- 192 Mates, L., Chuah, M. K. L., Belay, E., Jerchow, B., *et al.*, Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet* 2009, *41*, 753-761.
- 193 Jin, Z., Maiti, S., Huls, H., Singh, H., *et al.*, The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor. *Gene Ther* 2011, *18*, 849-856.

- 194 Woodard, L. E., Wilson, M. H., piggyBac-ing models and new therapeutic strategies. *Trends Biotechnol* 2015, *33*, 525-533.
- 195 Dupuy, A. J., Akagi, K., Largaespada, D. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature* 2005, *436*, 221-226.
- 196 Collier, L. S., Carlson, C. M., Ravimohan, S., Dupuy, A. J., Largaespada, D. A., Cancer gene discovery in solid tumours using transposon-based somatic mutagenesis in the mouse. *Nature* 2005, *436*, 272-276.
- 197 Dupuy, A. J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sleeping beauty: a novel cancer gene discovery tool. *Human molecular genetics* 2006, *15*, R75-R79.
- 198 Tower, J., Karpen, G. H., Craig, N., Spradling, A. C., Preferential Transposition of Drosophila-P Elements to Nearby Chromosomal Sites. *Genetics* 1993, *133*, 347-359.
- 199 Keng, V. W., Yae, K., Hayakawa, T., Mizuno, S., *et al.*, Region-specific saturation germline mutagenesis in mice using the Sleeping Beauty transposon system. *Nat Methods* 2005, *2*, 763-769.
- 200 Geurts, A. M., Collier, L. S., Geurts, J. L., Oseth, L. L., *et al.*, Gene mutations and genomic rearrangements in the mouse as a result of transposon mobilization from chromosomal concatemers. *PLoS genetics* 2006, *2*, 1413-1423.
- 201 Rosser, J. M., An, W. F., Repeat-induced gene silencing of L1 transgenes is correlated with differential promoter methylation. *Gene* 2010, *456*, 15-23.
- 202 Aiuti, A., Roncarolo, M. G., Ten years of gene therapy for primary immune deficiencies. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2009, 682-689.
- 203 Bainbridge, J. W., Ali, R. R., Success in sight: The eyes have it! Ocular gene therapy trials for LCA look promising. *Gene Ther* 2008, *15*, 1191-1192.
- 204 Biffi, A., Montini, E., Lorioli, L., Cesani, M., *et al.*, Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Benefits Metachromatic Leukodystrophy. *Science* 2013, *341*, 864-U858.
- 205 Nathwani, A. C., Tuddenham, E. G. D., Rangarajan, S., Rosales, C., *et al.*, Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *New Engl J Med* 2011, *365*, 2357-2365.
- 206 Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., *et al.*, LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003, *302*, 415-419.
- 207 Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., *et al.*, Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008, *118*, 3132-3142.
- 208 Baum, C., von Kalle, C., Staal, F. J. T., Li, Z. X., *et al.*, Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther* 2004, *9*, 5-13.
- 209 Mingozzi, F., High, K. A., Immune Responses to AAV in Clinical Trials. *Curr Gene Ther* 2011, *11*, 321-330.
- 210 Yant, S. R., Wu, X. L., Huang, Y., Garrison, B., *et al.*, High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals. *Mol Cell Biol* 2005, *25*, 2085-2094.
- 211 Berry, C., Hannonhalli, S., Leipzig, J., Bushman, F. D., Selection of target sites for mobile DNA integration in the human genome. *Plos Comput Biol* 2006, *2*, 1450-1462.
- 212 Kebriaei, P., Huls, H., Jena, B., Munsell, M., *et al.*, Infusing CD19-Directed T Cells to Augment Disease Control in Patients Undergoing Autologous Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Advanced B-Lymphoid Malignancies. *Hum Gene Ther* 2012, *23*, 444-450.

- 213 Thumann, G., Prospectives for Gene Therapy of Retinal Degenerations. *Curr Genomics* 2012, *13*, 350-362.
- 214 Cadiganos, J., Bradley, A., Generation of an inducible and optimized piggyBac transposon systemy. *Nucleic Acids Res* 2007, *35*.
- 215 Wu, S. C. Y., Meir, Y. J. J., Coates, C. J., Handler, A. M., *et al.*, piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to Sleeping Beauty, Tol2 and Mos1 in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, *103*, 15008-15013.
- 216 Wilson, M. H., Coates, C. J., George, A. L., PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther* 2007, *15*, 139-145.
- 217 Grabundzija, I., Irgang, M., Mates, L., Belay, E., *et al.*, Comparative Analysis of Transposable Element Vector Systems in Human Cells. *Mol Ther* 2010, *18*, 1200-1209.
- 218 Xue, X. K., Huang, X., Nodland, S. E., Mates, L., *et al.*, Stable gene transfer and expression in cord blood-derived CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells by a hyperactive Sleeping Beauty transposon system. *Blood* 2009, *114*, 1319-1330.
- 219 Liang, Q., Kong, J., Stalker, J., Bradley, A., Chromosomal Mobilization and Reintegration of Sleeping Beauty and PiggyBac Transposons. *Genesis* 2009, *47*, 404-408.
- 220 Geurts, A. M., Yang, Y., Clark, K. J., Liu, G. Y., *et al.*, Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Mol Ther* 2003, *8*, 108-117.
- 221 Zayed, H., Izsvak, Z., Walisko, O., Ivics, Z., Development of hyperactive Sleeping Beauty transposon vectors by mutational analysis. *Mol Ther* 2004, *9*, 292-304.
- 222 Wilson, M. H., Kaminski, J. M., George, A. L., Functional zinc finger/sleeping beauty transposase chimeras exhibit attenuated overproduction inhibition. *Febs Lett* 2005, *579*, 6205-6209.
- 223 Clark, K. J., Carlson, D. F., Leaver, M. J., Foster, L. K., Fahrenkrug, S. C., Passport, a native Tc1 transposon from flatfish, is functionally active in vertebrate cells. *Nucleic Acids Res* 2009, *37*, 1239-1247.
- 224 Mikkelsen, J. G., Yant, S. R., Meuse, L., Huang, Z., *et al.*, Helper-independent Sleeping Beauty transposon-transposase vectors for efficient nonviral gene delivery and persistent gene expression in vivo. *Mol Ther* 2003, *8*, 654-665.
- 225 Montini, E., Held, P. K., Noll, M., Morcinek, N., *et al.*, In vivo correction of murine tyrosinemia type I by DNA-mediated transposition. *Mol Ther* 2002, *6*, 759-769.
- 226 Lacoste, A., Berenshteyn, F., Brivanlou, A. H., An Efficient and Reversible Transposable System for Gene Delivery and Lineage-Specific Differentiation in Human Embryonic Stem Cells (vol 5, pg 332, 2009). *Cell Stem Cell* 2009, *5*, 568-568.
- 227 Li, M. A., Turner, D. J., Ning, Z. M., Yusa, K., *et al.*, Mobilization of giant piggyBac transposons in the mouse genome. *Nucleic Acids Res* 2011, *39*.
- 228 VandenDriessche, T., Ivics, Z., Izsvak, Z., Chuah, M. K. L., Emerging potential of transposons for gene therapy and generation of induced pluripotent stem cells. *Blood* 2009, *114*, 1461-1468.
- 229 Takahashi, K., Yamanaka, S., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006, *126*, 663-676.
- 230 Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., *et al.*, Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008, *26*, 101-106.
- 231 Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C., Jaenisch, R., Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 2005, *121*, 465-477.

- 232 Foster, K. W., Liu, Z. L., Nail, C. D., Li, X. N., *et al.*, Induction of KLF4 in basal keratinocytes blocks the proliferation - differentiation switch and initiates squamous epithelial dysplasia. *Oncogene* 2005, *24*, 1491-1500.
- 233 Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., *et al.*, A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011, *8*, 409-U452.
- 234 Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., *et al.*, Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010, *7*, 618-630.
- 235 Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger, K., Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008, *322*, 945-949.
- 236 Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., Bradley, A., Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 2009, *6*, 363-U369.
- 237 Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., *et al.*, Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009, *458*, 771-U112.
- 238 Li, X. H., Burnight, E. R., Cooney, A. L., Malani, N., *et al.*, piggyBac transposase tools for genome engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, *110*, E2279-E2287.
- 239 Bank, A., Hematopoietic stem cell gene therapy: selecting only the best. *J Clin Invest* 2003, *112*, 1478-1480.
- 240 Karlsson, S., Ooka, A., Woods, N. B., Development of gene therapy for blood disorders by gene transfer into haematopoietic stem cells. *Haemophilia* 2002, *8*, 255-260.
- 241 Miyoshi, H., Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Methods in molecular biology* 2004, *246*, 429-438.
- 242 Sumiyoshi, T., Holt, N. G., Hollis, R. P., Ge, S. D., *et al.*, Stable Transgene Expression in Primitive Human CD34(+) Hematopoietic Stem/Progenitor Cells, Using the Sleeping Beauty Transposon System. *Hum Gene Ther* 2009, *20*, 1607-+.
- 243 Belay, E., Matrai, J., Acosta-Sanchez, A., Ma, L., *et al.*, Novel Hyperactive Transposons for Genetic Modification of Induced Pluripotent and Adult Stem Cells: A Nonviral Paradigm for Coaxed Differentiation. *Stem Cells* 2010, *28*, 1760-1771.
- 244 Giordano, A., Galderisi, U., Marino, I. R., From the laboratory bench to the patients bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007, *211*, 27-35.
- 245 Yant, S. R., Meuse, L., Chiu, W., Ivics, Z., *et al.*, Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nat Genet* 2000, *25*, 35-41.
- 246 Podetz-Pedersen, K. M., Bell, J. B., Steele, T. W. J., Wilber, A., *et al.*, Gene Expression in Lung and Liver After Intravenous Infusion of Polyethylenimine Complexes of Sleeping Beauty Transposons. *Hum Gene Ther* 2010, *21*, 210-220.
- 247 Kren, B. T., Unger, G. M., Sjeklocha, L., Trossen, A. A., *et al.*, Nanocapsule-delivered Sleeping Beauty mediates therapeutic Factor VIII expression in liver sinusoidal endothelial cells of hemophilia A mice. *J Clin Invest* 2009, *119*, 2086-2099.
- 248 Hausl, M. A., Zhang, W. L., Muther, N., Rauschhuber, C., *et al.*, Hyperactive Sleeping Beauty Transposase Enables Persistent Phenotypic Correction in Mice and a Canine Model for Hemophilia B. *Mol Ther* 2010, *18*, 1896-1906.
- 249 Boehme, P., Doerner, J., Solanki, M., Jing, L., *et al.*, The Sleeping Beauty Transposon Vector System for Treatment of Rare Genetic Diseases: An Unrealized Hope? *Curr Gene Ther* 2015, *15*, 255-265.
- 250 Wally, V., Murauer, E. M., Bauer, J. W., Spliceosome-Mediated Trans-Splicing: The Therapeutic Cut and Paste. *J Invest Dermatol* 2012, *132*, 1959-1966.

- 251 Zayed, H., Xia, L., Yerich, A., Yant, S. R., *et al.*, Correction of DNA protein kinase deficiency by spliceosome-mediated RNA trans-splicing and Sleeping Beauty transposon delivery. *Mol Ther* 2007, *15*, 1273-1279.
- 252 Ivics, Z., Katzer, A., Stuwe, E. E., Fiedler, D., *et al.*, Targeted Sleeping Beauty transposition in human cells. *Mol Ther* 2007, *15*, 1137-1144.
- 253 Kettlun, C., Galvan, D. L., George, A. L., Kaja, A., Wilson, M. H., Manipulating piggyBac Transposon Chromosomal Integration Site Selection in Human Cells. *Mol Ther* 2011, *19*, 1636-1644.
- 254 Kolacsek, O., Erdei, Z., Apati, A., Sandor, S., *et al.*, Excision Efficiency Is Not Strongly Coupled to Transgenic Rate: Cell Type-Dependent Transposition Efficiency of Sleeping Beauty and piggyBac DNA Transposons. *Hum Gene Ther Method* 2014, *25*, 241-252.
- 255 Kolacsek, O., Krizsik, V., Schamberger, A., Erdei, Z., *et al.*, Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers. *Mobile DNA-Uk* 2011, *2*.
- 256 Apati, A., Orban, T. I., Varga, N., Nemeth, A., *et al.*, High level functional expression of the ABCG2 multidrug transporter in undifferentiated human embryonic stem cells. *Bba-Biomembranes* 2008, *1778*, 2700-2709.
- 257 Orban, T. I., Apati, A., Nemeth, A., Varga, N., *et al.*, Applying a "Double-Feature" Promoter to Identify Cardiomyocytes Differentiated from Human Embryonic Stem Cells Following Transposon-Based Gene Delivery. *Stem Cells* 2009, *27*, 1077-1087.
- 258 Weaver, S., Dube, S., Mir, A., Qin, J., *et al.*, Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. *Methods* 2010, *50*, 271-276.
- 259 D'Alessio, A. C., Weaver, I. C. G., Szyf, M., Acetylation-induced transcription is required for active DNA demethylation in methylation-silenced genes. *Mol Cell Biol* 2007, *27*, 7462-7474.
- 260 Livak, K. J., Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 2001, *25*, 402-408.
- 261 Grabundzija, I., Wang, J. C., Sebe, A., Erdei, Z., *et al.*, Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res* 2013, *41*, 1829-1847.
- 262 Olson, W. K., Gorin, A. A., Lu, X. J., Hock, L. M., Zhurkin, V. B., DNA sequence-dependent deformability deduced from protein-DNA crystal complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, *95*, 11163-11168.
- 263 Geurts, A. M., Hackett, C. S., Bell, J. B., Bergemann, T. L., *et al.*, Structure-based prediction of insertion-site preferences of transposons into chromosomes. *Nucleic Acids Res* 2006, *34*, 2803-2811.
- 264 Aluigi, M., Fogli, M., Curti, A., Isidori, A., *et al.*, Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006, *24*, 454-461.
- 265 Zayed, H., Izsvak, Z., Khare, D., Heinemann, U., Ivics, Z., The DNA-bending protein HMGB1 is a cellular cofactor of Sleeping Beauty transposition. *Nucleic Acids Res* 2003, *31*, 2313-2322.
- 266 Ellis, J., Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* 2005, *16*, 1241-1246.
- 267 Lavie, L., Kitova, M., Maldener, E., Meese, E., Mayer, J., CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *J Virol* 2005, *79*, 876-883.

- 268 Lorincz, M. C., Schubeler, D., Groudine, M., Methylation-mediated proviral silencing is associated with MeCP2 recruitment and localized histone H3 deacetylation. *Mol Cell Biol* 2001, *21*, 7913-7922.
- 269 Meilinger, D., Fellingner, K., Bultmann, S., Rothbauer, U., *et al.*, Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. *Embo Rep* 2009, *10*, 1259-1264.
- 270 Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Kabermann, A., *et al.*, Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Mol Ther* 2006, *13*, 59-66.
- 271 Jordan, A., Defechereux, P., Verdin, E., The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *Embo Journal* 2001, *20*, 1726-1738.
- 272 Gao, Q., Reynolds, G. E., Innes, L., Pedram, M., *et al.*, Telomeric transgenes are silenced in adult mouse tissues and embryo fibroblasts but are expressed in embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007, *25*, 3085-3092.
- 273 Moldt, B., Yant, S. R., Andersen, P. R., Kay, M. A., Mikkelsen, J. G., Cis-acting gene regulatory activities in the terminal regions of Sleeping Beauty DNA transposon-based vectors. *Hum Gene Ther* 2007, *18*, 1193-1204.
- 274 Walisko, O., Schorn, A., Rolfs, F., Devaraj, A., *et al.*, Transcriptional activities of the Sleeping Beauty transposon and shielding its genetic cargo with insulators. *Mol Ther* 2008, *16*, 359-369.
- 275 Rauschhuber, C., Ehrhardt, A., RNA Interference Is Responsible for Reduction of Transgene Expression after Sleeping Beauty Transposase Mediated Somatic Integration. *PloS one* 2012, *7*.
- 276 Chen, Z. Y., Riu, E., He, C. Y., Xu, H., Kay, M. A., Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol Ther* 2008, *16*, 548-556.
- 277 Chen, Z. Y., He, C. Y., Meuse, L., Kay, M. A., Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene Ther* 2004, *11*, 856-864.
- 278 Gill, D. R., Smyth, S. E., Goddard, C. A., Pringle, I. A., *et al.*, Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1 alpha promoter. *Gene Ther* 2001, *8*, 1539-1546.
- 279 Liu, G. Y., Aronovich, E. L., Cui, Z. B., Whitley, C. B., Hackett, P. B., Excision of Sleeping Beauty transposons: parameters and applications to gene therapy. *J Gene Med* 2004, *6*, 574-583.
- 280 Bian, Q. A., Belmont, A. S., BAC TG-EMBED: one-step method for high-level, copy-number-dependent, position-independent transgene expression. *Nucleic Acids Res* 2010, *38*.
- 281 Huang, X., Haley, K., Wong, M., Guo, H. F., *et al.*, Unexpectedly High Copy Number of Random Integration but Low Frequency of Persistent Expression of the Sleeping Beauty Transposase After Trans Delivery in Primary Human T Cells. *Hum Gene Ther* 2010, *21*, 1577-1590.
- 282 Charrier, S., Ferrand, M., Zerbato, M., Precigout, G., *et al.*, Quantification of lentiviral vector copy numbers in individual hematopoietic colony-forming cells shows vector dose-dependent effects on the frequency and level of transduction. *Gene Ther* 2011, *18*, 479-487.
- 283 Meir, Y. J. J., Weirauch, M. T., Yang, H. S., Chung, P. C., *et al.*, Genome-wide target profiling of piggyBac and Tol2 in HEK 293: pros and cons for gene discovery and gene therapy. *Bmc Biotechnol* 2011, *11*.

- 284 Huang, X., Guo, H. F., Tammana, S., Jung, Y. C., *et al.*, Gene Transfer Efficiency and Genome-Wide Integration Profiling of Sleeping Beauty, Tol2, and PiggyBac Transposons in Human Primary T Cells (vol 18, pg 1803, 2010). *Mol Ther* 2010, 18, 2038-2038.
- 285 Galvan, D. L., Nakazawa, Y., Kaja, A., Kettlun, C., *et al.*, Genome-wide Mapping of PiggyBac Transposon Integrations in Primary Human T Cells. *J Immunother* 2009, 32, 837-844.
- 286 Vigdal, T. J., Kaufman, C. D., Izsvak, Z., Voytas, D. F., Ivics, Z., Common physical properties of DNA affecting target site selection of Sleeping Beauty and other Tc1/mariner transposable elements. *J Mol Biol* 2002, 323, 441-452.
- 287 Liu, G. Y., Geurts, A. M., Yae, K., Srinivasan, A. R., *et al.*, Target-site preferences of Sleeping Beauty transposons. *J Mol Biol* 2005, 346, 161-173.
- 288 Kuduvalli, P. N., Rao, J. E., Craig, N. L., Target DNA structure plays a critical role in Tn7 transposition. *Embo Journal* 2001, 20, 924-932.
- 289 Katz, R. A., Gravuer, K., Skalka, A. M., A preferred target DNA structure for retroviral integrase in vitro. *J Biol Chem* 1998, 273, 24190-24195.
- 290 Jurka, J., Klonowski, P., Trifonov, E. N., Mammalian retroposons integrate at kinkable DNA sites. *J Biomol Struct Dyn* 1998, 15, 717-721.
- 291 Richmond, T. J., Davey, C. A., The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 2003, 423, 145-150.
- 292 Richardson, J. M., Dawson, A., O'Hagan, N., Taylor, P., *et al.*, Mechanism of Mos1 transposition: insights from structural analysis. *Embo Journal* 2006, 25, 1324-1334.
- 293 Fischer, S. E. J., van Luenen, H. G. A. M., Plasterk, R. H. A., Cis requirements for transposition of Tc1-like transposons in *C. elegans*. *Molecular and General Genetics* 1999, 262, 268-274.
- 294 Garcia-Saez, I., Plasterk, R. H. A., Purification of the *Caenorhabditis elegans* transposase Tc1A refolded during gel filtration chromatography. *Protein Express Purif* 2000, 19, 355-361.
- 295 Lipkow, K., Buisine, N., Lampe, D. J., Chalmers, R., Early intermediates of mariner transposition: Catalysis without synapsis of the transposon ends suggests a novel architecture of the synaptic complex. *Mol Cell Biol* 2004, 24, 8301-8311.
- 296 Auge-Gouillou, C., Brillet, B., Germon, S., Hamelin, M. H., Bigot, Y., Mariner Mos1 transposase dimerizes prior to ITR binding. *J Mol Biol* 2005, 351, 117-130.
- 297 Shibano, T., Takeda, M., Suetake, I., Kawakami, K., *et al.*, Recombinant Tol2 transposase with activity in *Xenopus* embryos. *Febs Lett* 2007, 581, 4333-4336.
- 298 Jaillet, J., Genty, M., Cambefort, J., Rouault, J. D., Auge-Gouillou, C., Regulation of mariner transposition: the peculiar case of Mos1. *PLoS One* 2012, 7, e43365.
- 299 Bire, S., Casteret, S., Arnaoty, A., Piegu, B., *et al.*, Transposase concentration controls transposition activity: Myth or reality? *Gene* 2013, 530, 165-171.
- 300 Kameda, T., Smuga-Otto, K., Thomson, J. A., A severe de novo methylation of episomal vectors by human ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 349, 1269-1277.
- 301 Carlson, D. F., Geurts, A. M., Garbe, J. R., Park, C. W., *et al.*, Efficient mammalian germline transgenesis by cis-enhanced Sleeping Beauty transposition. *Transgenic Res* 2011, 20, 29-45.
- 302 Jursch, T., Miskey, C., Izsvak, Z., Ivics, Z., Regulation of DNA transposition by CpG methylation and chromatin structure in human cells. *Mobile DNA-UK* 2013, 4.

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: KOLACSEK ORSOLYA

MTMT-azonosító: 10035728

A doktori értekezés címe és alcíme: DNS TRANSZPOZON ALAPÚ GÉNBEVITELI ELJÁRÁSOK VIZSGÁLATA EMLŐS RENDSZEREKBE

DOI-azonosító³⁹: 10.15476/ELTE.2016.170

A doktori iskola neve: BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

A doktori iskolán belüli doktori program neve: KLASSZIKUS ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKA DOKTORI PROGRAM

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Orbán Tamás, Ph.D.

A témavezető munkahelye: MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA, TERMÉSZETTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT, ENZIMOLÓGIAI INTÉZET

II. Nyilatkozatok

A doktori értekezés szerzőjeként⁴⁰

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi Kar Dékáni Hivatalának Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportja ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;⁴¹

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;⁴²

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.⁴³


2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2016.12.01.


.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

³⁸ Beiktatta az Egyetemi Doktori Szabályzat módosításáról szóló CXXXIX/2014. (VI. 30.) Szen. sz. határozat. Hatályos: 2014. VII.1. napjától.

³⁹ A kari hivatal ügyintézője tölti ki.

⁴⁰ A megfelelő szöveg aláhúzendő.

⁴¹ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell adni a tudományági doktori tanácshoz a szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentést tanúsító okiratot és a nyilvánosságra hozatal elhalasztása iránti kérelmet.

⁴² A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a minősített adatra vonatkozó közokiratot.

⁴³ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a mű kiadásáról szóló kiadói szerződést.