

DNS TRANSZPOZON ALAPÚ GÉNBEVITELI ELJÁRÁSOK VIZSGÁLATA EMLŐS RENDSZEREKBE

Doktori értekezés tézisei

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

Bevezetés

A mozgó genetikai elemeket (vírusok, transzpozonok) sokáig a genom „parazitáinak” tekintették, hisz egyetlen céljuk önmaguk genetikai anyagának sokszorozása. A transzpozonok hosszabb tartózkodása azonban jelentősen formálja a genomot, mert aktivitásuknak köszönhetően és azt követően is nagy léptékű változásokat idéznek elő. Hozzájárulnak a variabilitáshoz, szerepet játszhatnak az adaptálódásban, valamint a speciációban. Számos transzpozáz struktúrájú fehérje ismert, melyek különböző funkciókra domesztikálódtak a sejtekben.

A vírusok és transzpozonok genetikai eszközként való felhasználása forradalmasította a biológiai kutatásokat, mind a mutagenézis, mind a génbeviteli eljárásokban való alkalmazásuk kapcsán. A DNS transzpozonok kihaltak a gerincesek genomjából, a retrotranszpozonok azonban endogén működőképességük miatt mutagenézisre alkalmazhatók. Am transzpozíciós mechanizmusuk alapján újra mobilizálódhatnak, emellett jelentős számban részleges integrációkat hoznak létre [1, 2], és az endogén elemekhez hasonlóan csendesülésük várható az emlős rendszerekben. A retrotranszpozonok ezen tulajdonságai a génbevitelre és génterápiára nem teszik alkalmassá őket. A kedvező tulajdonságokkal rendelkező DNS transzpozonok gerinces alkalmazására az *Sleeping Beauty* (SB) megjelenéséig várni kellett, melyet hal genomból állítottak helyre, és humán sejtekben is aktívnak bizonyult [3]. Az SB teljesen véletlenszerű integrációs profiljának, és a számos preklinikai vizsgálatnak köszönhetően mára klinikai kipróbálási fázisba léphetett speciális leukémiák és limfómák *ex vivo* génterápiás kezelésében [4], valamint a leggyakoribb retinadegenerációk *in vivo* génterápiás gyógyításában [5]. Idővel más DNS transzpozonokról is kiderült, hogy működőképesek a gerinces modellorganizmusokban. A rovar genomból izolált természetes módon aktív *piggyBac* (PB) szintén jelentős hatékonysággal bír a heterológ rendszerekben [6]. A hiperaktív transzpozáz variánsok fejlesztésének köszönhetően a két rendszer hatékony alternatívája lett a virális rendszereknek, melyek tumorigenikus potenciáljuk miatt kizorulóban vannak a génterápia területéről [7, 8].

A transzpozonok terápiás 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 [9, 10]. Ezek sejtípustól függő különbségekre mutatnak rá, többségük azonban csak egy-egy – gyakran tumoros – sejtípus

vizsgálatára korlátozódott, és a különböző tanulmányok az egyes applikációk eltérései miatt sokszor nem összehasonlíthatók. Emellett a génbevitel hatékonyságát a DNS transzpozonokra jellemző, a transzpozáz dózistól függő ún. „túltermeléses gátlás” jelensége jelentősen csökkentheti [11]. Az SB és PB rendszerek összehasonlítására vonatkozó tanulmányokban található ellentmondásos adatokat gyakran a gátlásra való eltérő hajlammal magyarázzák, melyet nem mindig tesztelnek. Munkám során elsődleges célom a DNS transzpozonnal történő génbevitel sejtszintű vizsgálata és optimalizálása volt.

Célkitűzések

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

Módszerek

- GFP transzgén expressziós megtartási dinamikáját vizsgáltuk hosszabb távon SB-vel történő génbevitelt követően populációban fenntartott sejteken, melyeket a transzfekció alapján dúsítottunk FACS segítségével, illetve dúsítás nélkül is monitoroztunk.
- GFP transzgén csendesülését trichostatin A (TSA), valamint 5-Aza-cytidine kezelésekkel vizsgáltuk. A kezelés hatását FACS-on monitoroztuk, és a derepresszálo kezelés működőképességét kvantitatív PCR-rel (qPCR) kontrolláltuk.

- SB transzpozon tartalmú genetikailag uniformis sejtklónokat hoztunk létre a kópiaszám mérés beállításához.
- Splinkerette PCR technikát alkalmaztunk SB-vel létrehozott transzgenikus sejtklónok integrációs helyeinek azonosítására.
- Integrációs helyek karakterizálására vizsgáltuk a szekvencia TA denzitását, valamint a DNS struktúra deformálhatóságára jellemző Vstep görbét.
- Transzgenikus sejtszám monitorozására antibiotikum (puromycin) rezisztenciát tartalmazó transzgént alkalmaztunk és kolóniaesszét végeztünk. Humán embrionális őssejteken GFP transzgén megtartását vizsgáltuk oly módon, hogy a populációban tartott sejtek transzgenikus GFP arányát normalizáltuk a transzfekeiót követően mért GFP aránnyal.
- A génbeviteli kísérletek során a sejtekben megfigyelhető transzpozáz aktivitást a transzpozon donor kivágódásának mérésével monitoroztuk, melyre qPCR esszét dolgoztunk ki.
- A kivágási aktivitás és a transzgenikus hatékonyság monitorozása mellett a különböző kondíciókkal végzett génbeviteli kísérleteket az elért átlagos kópiaszámokkal is jellemeztük.

Eredmények

- Az *ex vivo* génterápiát modellező sejtkultúrás rendszerünkben a szelekció génmegtartásra gyakorolt markáns hatása figyelhető meg. Jelentős szelekciós hátrányt jelent a CMV promóterrel szabályozott transzgén expressziója.
- A transzgén valamilyen arányú csendesülése (a sejtek legalább 10%-a) közvetlen a sejtekbe történő bejuttatást követően megfigyelhető.
- Az SB-vel bevitt transzgenikus GFP expresszió teljes csendesülését azonban nem tapasztaltuk a bejuttatást követő 6 hétig. Ugyanakkor a GFP-t expresszáló sejtek csillapítják az expresszió intenzitását az erősnek számító CAG és CMV promóterek esetén.

- Az SB transzpozázal kivitelezett génbevitelből származó transzgenikus klónokban talált integrációk kivétel nélkül transzpozíció eredményei, SB-re jellemző TA célhelyek, melyek speciális deformálhatósági Vstep görbe karakterrel jellemezhetők.
- A sejtekben megfigyelhető transzpozáz aktivitás monitorozására qPCR esszét dolgoztunk ki, mely a donor kivágódásának eseményeit detektálja. Az esszét a transzpozon donor plazmidon megtalálható ampicillin rezisztencia gén detektálására normalizáltuk, így a mérés független a transzfekciós hatékonyságoktól és a különböző sejtípusok is összehasonlíthatók.
- A transzpozon kópiaszám megbízható mérésére három különböző qPCR esszét dolgoztunk ki, melyek közül az SB jobb és bal transzpozon szekvenciákra specifikusak transzgéntől függetlenek, tehát az SB bármilyen applikációja esetén használhatók.
- Háromféle sejtípuson tesztelve a túltermeléses gátlás 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 túltermeléses gátlását nem tapasztaltuk, a transzgenikus sejtszámokban ugyanakkor telítődés jelentkezik mindegyik rendszernél.
- Vizsgálataink sejtípustól függő eltéréseket mutatnak. Valamennyi transzpozáz aktivitására a HEK-293 sejt a leginkább permisszív, ennek ellenére több HeLa sejt tehető transzgenikussá. Az embrionális őssejtekben viszont a transzpozáz aktivitás egy nagyságrenddel alacsonyabbnak bizonyult.
- 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, és embrionális őssejteken szintén kedvezően alkalmazható.
- A transzgenikus hatékonyságok számos esetben nem tükrözték a kivágási aktivitásokat, melyre szintén példa, hogy az SB32 variáns magasabb transzgenikus rátákat eredményezett HEK-293 sejtben, mint a hiperaktív SB100X. Mindazonáltal a nehezen módosítható embrionális őssejteken elsősorban a hiperaktív variánsok eredményeznek kielégítő génbevitelt.
- Az SB esetén egészen magas kópiaszámok érhetőek el (akár 40 kópia/sejt), míg az mPB és a hyPB esetén csak néhány kópia.

- A kópiaszám csökkentésének hatékony módja a szubsztrát (transzpozon donor) limitációja, amely kielégítő transzgenikus hatékonyságot biztosít a hiperaktív variánsok magas dózisú alkalmazásakor.
- A transzgénben alkalmazott promóterek expresszivitása befolyásolja az SB génbeviteli hatékonyságát, egyrészt a transzpozáz *ab ovo* aktivitásán keresztül, másrészt a CMV promóter esetén a sejtek korlátozott toleranciája miatt.

Következtetések

A transzgén expresszió szelektív 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 különböző transzgének esetén eltérő sejtes tolerancia várható, így az expresszió dózisének óvatos megválasztása javasolt a szelektív hatás kiküszöbölésére. Az optimális dózis elérése érdekében az intenzitásbeli csendesülés elkerülése fontos lehet.

Az irodalmi adatokkal egybehangzóan az SB célhelyeinek genomialis eloszlása teljesen véletlenszerű, azonban a DNS strukturális jellegzetességei miatt az integráció lokálisan nem random. A célszekvenciák fele az adott régióban rendelkezésre álló TA helyeknek csak 10%-át érinti, így a várható pozíciók megjósolhatók.

A túltermeléses gátlás jelenségére vonatkozó vizsgálataink azt támasztják alá, hogy a sejtes közegben megfigyelhető gátlás kevésbé jól körülhatárolható jelenség, amely nem feltétlen prediktálható, ezért a génbevitel optimalizálása minden applikáció esetén ajánlott.

Az SB és PB rendszerek hatékonyságának összehasonlítása eltérő eredményre vezetett a különböző sejtekben, és az általános vélekedéssel ellentétben a gátlásra való hajlam esetünkben ezt nem magyarázza. 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. 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.

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, melyre bizonyíték az integráció defektív transzpozáz variánsok előállításának lehetősége.

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 transzgen 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, 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.

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

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, Pászty K, Hegedűs 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

Irodalomjegyzék

1. Ostertag, E.M. and H.H. Kazazian, Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annual Review of Genetics*, 2001. **35**: p. 501-538.
2. An, W.F., 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**(49): p. 18662-18667.
3. Ivics, Z., et al., Molecular reconstruction of Sleeping beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 1997. **91**(4): p. 501-510.
4. Kebriaei, P., et al., Infusing CD19-Directed T Cells to Augment Disease Control in Patients Undergoing Autologous Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Advanced B-Lymphoid Malignancies. *Human Gene Therapy*, 2012. **23**(5): p. 444-450.
5. Thumann, G., Prospectives for Gene Therapy of Retinal Degenerations. *Current Genomics*, 2012. **13**(5): p. 350-362.
6. Ding, S., et al., Efficient transposition of the piggyBac resource (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 2005. **122**(3): p. 473-483.
7. Mates, L., et al., Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nature Genetics*, 2009. **41**(6): p. 753-761.
8. Yusa, K., et al., A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011. **108**(4): p. 1531-1536.
9. Grabundzija, I., et al., Comparative Analysis of Transposable Element Vector Systems in Human Cells. *Molecular Therapy*, 2010. **18**(6): p. 1200-1209.
10. Huang, X., 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). *Molecular Therapy*, 2010. **18**(11): p. 2038-2038.
11. Bouuaert, C.C., et al., The autoregulation of a eukaryotic DNA transposon. *Elife*, 2013. **2**.