

MTA doktori értekezés tézisei

**„Nem-kódoló” és invazív elemek az eukarióta genomokban:
szerepük és orvosbiológiai hasznosításuk**

Orbán Tamás István



Molekuláris Élettudományi Intézet



MTA
Kiváló Kutatóhely

Budapest

2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés.....	3
1.1. A „nem-kódoló” genomról röviden.....	3
1.2. Az RNS interferenciához köthető nem-kódoló elemek.....	4
1.3. Mobilis genetikai elemek – a nem-kódoló régiók fontos összetevői.....	5
2. Célkitűzések	6
3. Eredmények és megvitatásuk	7
3.1. Az RNS interferenciához köthető nem-kódoló elemek vizsgálata.....	7
3.1.1. Az siRNS rendszer - a célzott RNS degradáció mechanizmusa.....	7
3.1.2. Egy speciális miRNS érési útvonal: a mirtronok.....	8
3.1.3. Változatok egy lókuszról: miRNS karhasználat és a 3' izomiR-ek.....	11
3.1.4. miRNS-ek klaszterekben.....	13
3.2. Mobilis genetikai elemek – genomi szerepük és felhasználásuk	15
3.2.1. piggyBac-szerű elemek a humán genomban	15
3.2.2. piggyBac transzpozázok: rendezetlenség a végeken	17
3.2.3. A transzpozon alapú rendszerek tulajdonságai – a kópiaszám pontos meghatározása.....	20
3.2.4. A transzpozon alapú rendszerek tulajdonságai – a génbevitel finomhangolása.....	22
3.2.5. Transzgenikus sejt- és állatmodellek transzpozonokkal: a szívizomtól a patkányveséig....	24
4. Az új tudományos eredmények összefoglalása.....	26
5. Az alkalmazott metodikák áttekintése.....	28
6. A disszertáció alapját képező közlemények.....	29
7. Köszönetnyilvánítás	32
8. Irodalomjegyzék.....	34

1. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

„Egy modern felfedezés azért felfedezés, mert ellentétben áll az összes ismert tudással.

Ha nem áll ellentétben, akkor csak egy kis adalék.”

(Szent-Györgyi Albert)

1.1. A „nem-kódoló” genomról röviden

A XX. század utolsó két évtizedében indított genom projektek azzal a reménnyel kecsegtettek, hogy egy élőlény örökítőanyagának, a dezoxiribonukleinsav (DNS) bázissorrendjének a meghatározásával egyértelműen fel lehet térképezni a működést biztosító géneket és szabályozó elemeket. Ez a kijelentés ugyan nyilván megállja a helyét, az eredmények azonban sok esetben sem a várt gének számában, sem ezek egy genomon belüli arányában nem egyeztek meg a korábbi predikciókkal és várakozásokkal. Ennek az egyik nyilvánvaló oka az volt, hogy a megelőző időszak kutatásai alapján géneknek legfőképpen a „kódoló” (értsd fehérjekódoló) szekvenciákat tekintették, bár az alaposabb definíciók megemlégtették a már akkor is ismert RNS-kódoló géneket, mint például a riboszómális (rRNS) vagy a transzfer RNS (tRNS) géneket. A humán genom esetében például az akkor ismert fehérje repertoár alapján a gének számát 100 000 körülire becsülték, az emberi genomszekvencia első „piszkozata” azonban elég nagy csalódást okozott: mindösszesen ~30 000 fehérjekódoló gént sikerült azonosítani, és ami még megdöbbentőbb volt, hogy ezek a teljes genomnak csak egy kis töredékét, kevesebb mint 5%-át tették ki (Lander és mtsai, 2001; Venter és mtsai, 2001). Az ezt követő vizsgálatok és az egyre pontosabb annotálások a fehérjekódoló gének számát tovább csökkentették, és a legfrissebb adatok alapján ezek száma az emberi genomban kicsivel 20 000 alattira tehető (Nurk és mtsai, 2022). A számok több szempontból is zavarba ejtőek, hiszen az emberi gének száma így arányaiban nem sokkal múlja felül a kevésbé „komplexnek” gondolt modellorganizmusok génjeinek a számát. Ezek az eredmények nagyon sok kérdést vetettek fel, és rengeteg további kutatási irányt jelöltek ki, amelyek részben rávilágítottak a genomiális működés több, eddig ismeretlen aspektusára.

A genom szerkezetével kapcsolatos egyik legfontosabb probléma az volt, hogy a fehérjekódoló gének szekvenciái az emberi genomnak miért csak a ~2%-át, az exonoknál általában jóval hosszabb intronokkal együtt is csak ~5%-át teszik ki? (Pennisi, 2005) Mi van a géneken „túl”? A genom nem-kódoló részei pusztán haszontalan „szemétnek”, „junk” DNS-nek tekinthetők? A kérdés megválaszolására irányuló kutatások egyre több esetben igazolták, hogy a „nem-kódoló” régióknak is nagyon fontos szerepe van a genetikai anyag

szabályozásában. A több párhuzamos szálon elindult kutatások első igazán izgalmas, ugyanakkor elgondolkodtató eredményeit minden kétséget kizáróan az ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) projekt szolgáltatta. Nagyszámú sejtvonal igen sokféle vizsgálata alapján a projekt legfontosabb üzenete az volt, hogy az emberi genom minimum 80%-áról történik valamilyen sejtípusban génátírás – hozzáteve, hogy az ebből a szempontból „legaktívabb” sejtekben is egyszerre maximum a genom ~57%-áról történik transzkripció. A kutatók ugyanakkor hangsúlyozták, hogy a nagyszámú átírat jelentős részéhez egyelőre nem tudnak „hagyományos” biokémiai funkciót társítani, de az eredmények tükrében mégis fontosnak tartották, hogy a gén fogalmán finomítsanak. A definíció szerint továbbra is a DNS egy adott szakaszát tekintjük génnek, amely komplementer RNS molekulákat, transzkriptum izoformákat kódol, de a továbbiakban magukat a transzkriptumokat kell az öröklődés alapvető egységeinek tekinteni. A gén fogalma ehhez kapcsolódva pedig egy magasabb rendű egységet takar: adott transzkriptumok hálózatát, amelyek együttesen alakítanak ki egy fenotípust (Djebali és mtsai, 2012). Az eredmények interpretálásának azonban jócskán akadtak kritikusi is: a szkeptikusok fő érvei azon alapultak, hogy jelenleg nagyon nehéz definiálni a „biológiai zaj” fogalmát, és ismert funkció hiányában egy DNS szakasz esetleges átíródása okán azt nem lehet feltétlenül biológiailag fontos működésként interpretálni (Graur és mtsai, 2013). Kétségtelen tény, hogy az ENCODE projekt a rengeteg adat mellett sok esetben nem szolgált magyarázattal új funkciókra, ugyanakkor a technológia robbanásszerű fejlődése kapcsán elérhetővé vált új metodikákkal igenis új utakat és irányokat szabott a molekuláris genetikai kutatásoknak.

1.2. Az RNS interferenciához köthető nem-kódoló elemek

Mi van tehát a géneken túl, mit találunk a nem-kódoló régiókban? Az elmúlt két évtizedben a technológiai forradalomnak köszönhetően egyre részletesebben sikerült megismerni a korábban a kozmológiai kutatások mintájára „sötét anyagnak” is elnevezett genomiális régiókat (Johnson és mtsai, 2005), amely feltérképezésének egyik legizgalmasabb vetületét a nagyszámú RNS-kódoló gén jelenti. Ma már tudjuk, hogy ezek között jelentős számban találunk szabályozó funkciójú, úgynevezett kisRNS géneket, amelyek az RNS interferencia (RNAi) különböző útvonalaihoz kapcsolódnak. Ezek közös jellemzője, hogy olyan ribonukleoprotein-komplexek vesznek benne részt, amelyek rövid (20-35 nukleotid hosszúságú), egyszálú RNS molekulát tartalmaznak, és mindig megtalálható bennük az Argonaute fehérjecsaldó egy képviselője. Funkcionális szempontból ezek többségükben géncsendesítést végző szabályozó

komplexek, hatásukat pedig transzkripcionális vagy poszttranszkripcionális szinten fejtik ki: a citoplazmában működő komplexek neve „RISC” (=RNA-Induced Silencing Complex), míg a sejtmagi komplexeké „RITS” (=RNA-Induced Transcriptional Silencing) komplex (Ghildiyal és Zamore, 2009). A kutatásaink során vizsgált siRNS, illetve a piRNS útvonalak közös jellemzője, hogy egyfajta molekuláris immunrendszerként működve invazív genetikai elemek, elsősorban vírusok vagy transzpozonok ellen védik a sejtek genetikai állományát. A miRNS rendszer ugyanakkor az evolúció során a gazdagenom saját génjeit reguláló endogén szabályozási hálózattá fejlődött ki, amely a legtöbb eukarióta sejtben előfordul, és komplexitásában összemérhető a transzkripció faktorok alkotta szabályozási hálózattal (Gebert és MacRae, 2019). Az elmúlt időszakban kutatásaink egyik célpontját az siRNS és a miRNS útvonalak molekuláris részleteinek a feltérképezése jelentette.

1.3. Mobilis genetikai elemek – a nem-kódoló régiók fontos összetevői

Ma már tudjuk, hogy nagyon sok genom meghatározó részét, a repetitív szekvenciák egy jelentős hányadát mobilis genetikai elemek, a transzpozonok teszik ki. Transzpozonok alatt olyan, prokariótákban és eukariótákban egyaránt előforduló DNS szekvenciákat értünk, amelyek képesek áthelyeződni egy DNS lókusztól egy másikra. A transzpozonokat többféle szempont alapján lehet csoportosítani (Wicker és mtsai, 2007): a legelterjedtebb, és egyben a modern transzpozon osztályozás alapját is képező szempont a transzpozícióban résztvevő intermedier alapján történő csoportosítás, így megkülönböztetve az **RNS** (más néven Retro-, vagy *Class I*) **transzpozonokat** a **DNS** (más néven *Class II*) **transzpozonoktól**. A transzpozonok között vannak a mai napig aktív molekuláris paraziták, vannak az evolúciós folyamatok során inaktívvá vált „halott” szekvenciák, és vannak olyan elemek, amelyek a gazdagenom szempontjából hasznosulva endogén funkciókra domesztikálódtak (Cosby és mtsai, 2019). Ehhez kapcsolódva az általam vezetett laboratórium másik kutatási célpontját a DNS transzpozonok jelentik. Kiemelten foglalkozunk a *piggyBac* szupercsalád evolúciós változásaival, illetve az aktív transzpozonok működésének molekuláris mechanizmusával. Ez a transzpozon azért is nagy jelentőségű, mert széles körben alkalmazzák génbeviteli eljárásokban, illetve génterápiás fejlesztések során egyaránt (Ding és mtsai, 2005; Yusa és mtsai, 2011). A disszertáció utolsó részében pedig azokat a vizsgálatokat mutatom be, amelyek során a DNS transzpozon alapú génbevitel különféle aspektusainak a jobb megismerését, és a módszerek optimalizálását végeztük.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A PhD fokozat megszerzése óta eltelt időszakban kutatásaim a genomok „nem-kódolóknak” vagy „invazívknak” nevezett régióira irányultak. Igyekeztem olyan tudományos kérdéseket feltenni, amelyekkel nemcsak a vizsgált RNS és DNS szekvenciák evolúciósan kialakult funkcióira derülhet fény, hanem esetleg lehetőség nyílik ezen elemek molekuláris genetikai vagy orvosi biológiai felhasználására is. A jelen disszertációban bemutatott vizsgálatokat alapvetően két témakörben folytattam, az ezekhez kapcsolódó kutatási célok pedig a következő pontokban fogalmazhatók meg:

1. Az RNS interferencia különböző folyamatainak a megértése, ezen belül:

- ❶ az siRNS útvonal által kiváltott RNS degradáció molekuláris mechanizmusának a feltárása;
- ❷ egy speciális miRNS csoport, a splicing folyamatával összekapcsolt mirtron útvonal feltérképezése emlős rendszerekben;
- ❸ a miRNS-ek érése során a karhasználat és az izomiR-ek képződésének vizsgálata;
- ❹ a klaszterekben elhelyezkedő miRNS-ek speciális érési folyamatainak a vizsgálata.

2. A DNS transzpozonok működésének és evolúciójának részletes vizsgálata, ezen belül:

- ❶ a *piggyBac* elemek működésének és domesztikációjának vizsgálata különböző genomokban;
- ❷ a DNS transzpozonokkal végrehajtott génbevitel molekuláris jellemzői a *Sleeping Beauty* és a *piggyBac* rendszerek példáján;
- ❸ transzgenikus sejt- és állatmodellek létrehozása és részletes karakterizálása DNS transzpozonok segítségével.

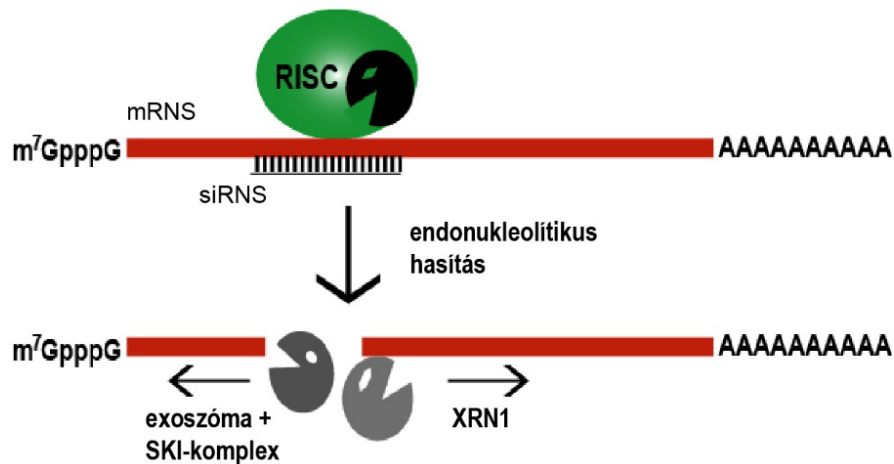
3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

3.1. Az RNS interferenciához köthető nem-kódoló elemek vizsgálata

3.1.1. Az siRNS rendszer - a célzott RNS degradáció mechanizmusa

A kísérletekhez létrehoztunk több S2 (Schneider) *Drosophila* sejtvonalat, amelyek különböző riporter konstrukciókat expresszáltak: voltak intront tartalmazó és nem tartalmazó riporterek, illetve ezeket konstitutív aktin promóterrel, vagy indukálható metallothionein promóterrel meghajtott konstrukciók. A vizsgálatok során az RNS interferenciát a riporter gének középső szekvenciájára specifikus dsRNS molekulák transzfektálásával váltottuk ki, majd a riporter konstrukciók 5' és 3' végeire specifikus próbákkal, *Northern* analízis segítségével vizsgáltuk a degradáció folyamatát. A kérdésünk az volt, hogy milyen géntermékek vesznek részt a RISC által kijelölt cél-mRNS molekulák eliminálásában. Az RNAi szempontjából kulcsfontosságú kérdés az volt, hogy az akkor ismert négy *Drosophila* Argonaute fehérje közül ebben a folyamatban melyik vesz részt a RISC komplex felépítésében. Vizsgálataink egyértelműen igazolták, hogy az RNS degradáció mechanizmusában az Ago2 játszik szerepet, míg az Ago1, a Piwi és az Aubergine fehérjék csendesítése a riporter gén expressziós szintjére nem volt hatással. Akkori kísérleteinkben azonban mi még nem tudtuk igazolni, később azonban már bizonyítást nyert, hogy maga az Ago2 rendelkezik az endonukleáz („*slicer*”) aktivitással (Ghildiyal és Zamore, 2009). A továbbiakban különböző RNS lebomlási útvonalak ismert komponenseit teszteltük: az 5'→3' degradáció főszereplőjeként az Xrn1 exonukleázt, míg a 3'→5' degradációs folyamatok szereplői közül az exoszóma több komponensét, illetve az útvonalban fontos szerepet játszó RNS-helikáz komplex, a Ski-komplex összetevőit vizsgáltuk. Az eredmények azt mutatták, hogy az Xrn1 csendesítése a dsRNS által megcélzott régiótól 3' irányban elhelyezkedő degradációs intermediert stabilizálja, és a teljes hosszúságú riporter transzkriptummal szemben ennek az intermedierek a féléletidejét jelentősen megnöveli. Ugyanakkor, ha az exoszóma és a Ski-komplex komponenseit csendesítettük, akkor viszont az 5' fragmentum stabilitása növekedett meg. Igazolni tudtuk továbbá, hogy az 5' intermedierek még megtalálható az 5'-sapka szerkezet, így a lebontási folyamatokban a „*decapping*” enzimek nem vesznek részt, a 3' fragmentum esetében pedig kimutattuk, hogy tartalmaztak poliA szekvenciát, lebomlásukban tehát a deadenilázok nem vesznek részt.

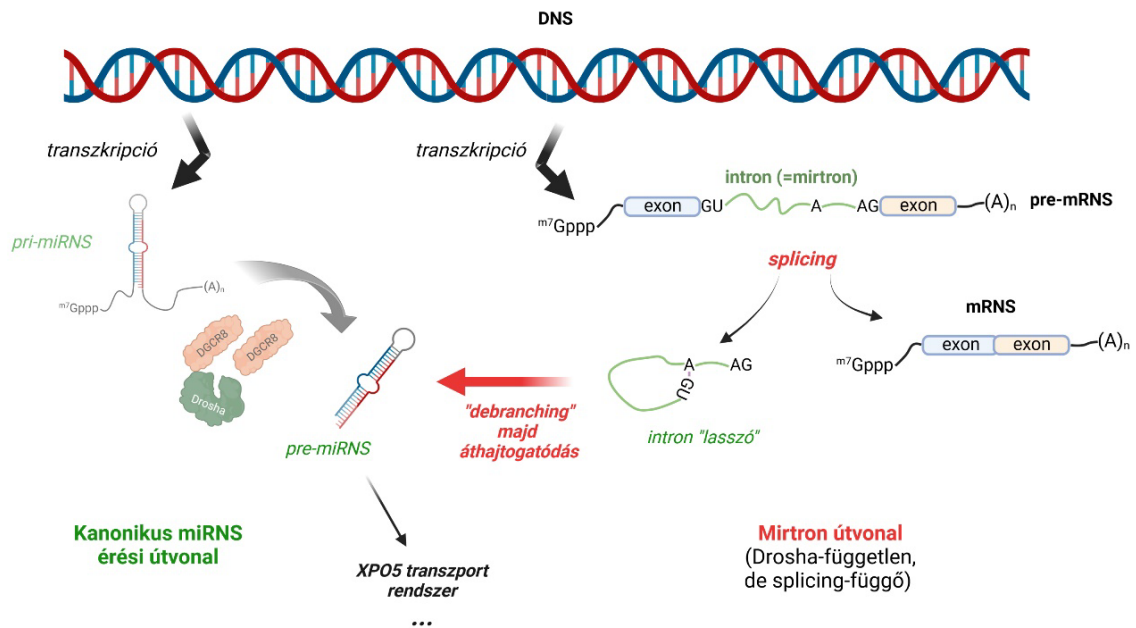
Az előbbieken leírt kísérletek kapcsán felállítottunk egy modellt, amely a RISC által kiváltott, endonukleázos hasítással kezdődő RNS degradáció általános modelljévé vált (Orban és Izaurralde, 2005). A komplexben található egyszálú kisRNS molekula bázispárosodáson keresztül kijelöli a lebontásra kijelölt cél-RNS molekulát, és az érintett szakaszon megtörténik a cukor-foszfát gerinc elhasítása. Az RNS lebomlása ezt követően a hasítási ponttól folytatódik: a 3' intermedier lebontását az Xrn1 fehérje végzi el, míg az 5' intermedier lebomlásáért az exoszóma a felelős, amelynek a folyamathoz szüksége van a Ski-komplexre is (**1. ábra**). Mások későbbi kísérletei igazolták, hogy az általunk leírt degradációs mechanizmus valóban általánosnak bizonyult (Pillai, 2005; Zamore és Haley, 2005). A RISC által kiváltott endonukleázos hasítás, és a cél-RNS molekulák lebomlási folyamata úgy tűnik, hogy az egész eukarióta világban hasonló módon zajlik le, és ennek a feltérképezésében a korábban említett munkánkkal mi is tevékeny részt vettünk.



1. ábra: Az siRNS útvonalon inicializált mRNA degradáció kísérleteinken alapuló modellje.

3.1.2. Egy speciális miRNS érési útvonal: a mirtronok

A mirtronok olyan miRNS szekvenciák a genomban, ahol a pre-miRNS tulajdonképpen egy fehérjekódoló gén egy intronját jelenti. Az érésük a „gazda” mRNA splicing folyamatához kötött: a Drosha/DGCR8 komplex helyett a splicing hozza létre pre-miRNS-t, amely ezután bekapcsolódik a kanonikus érési útvonalba (**2. ábra**). A mirtronokat, ezeket a Drosha-független úton érő miRNS molekulákat *Drosophila* és *C. elegans* rendszerekben fedezték fel (Okamura és mtsai, 2007; Ruby és mtsai, 2007), ugyanakkor az emlős genomok esetében funkcionális tesztek nélkül, pusztán bioinformatikai predikciókra hagyatkozva biztosra vették a mirtronok előfordulását (Berezikov és mtsai, 2007).

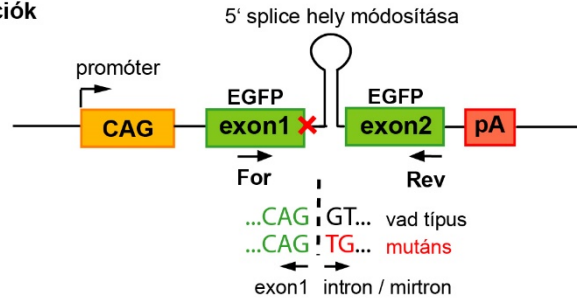


2. ábra: A mirtron útvonal összehasonlítása a kanonikus miRNS érési útvonallal. A mirtronok rövid, a pre-miRNS-nek megfelelő intronok, amelyek legtöbbször fehérjekódoló gének intronjainak feleltethetők meg. Az intron 5' és 3' végén a meghatározó nukleotid szekvenciák, illetve az intronon belül a splicing szempontjából kulcsfontosságú elágazási pont adenin nukleotidja vannak feltüntetve. A lasszó formájú intron az átszerkesztését követően belép a kanonikus útvonalba.

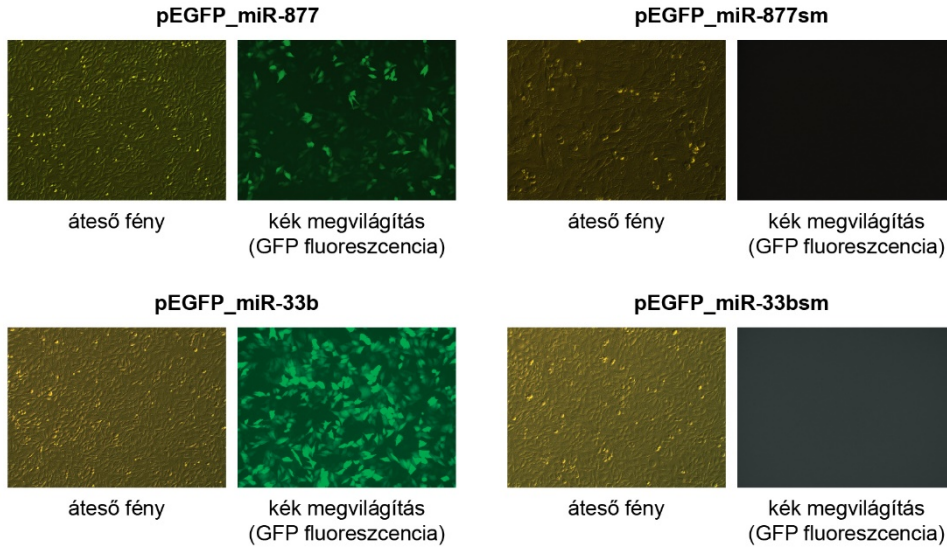
Az ábra a *biorender.com* alkalmazással készült.

Kutatásaink során kiválasztottunk néhány mirtronnak prediktált humán miRNS szekvenciát és megvizsgáltuk, hogy ezek érési folyamatai mennyiben kapcsolódnak a splicing folyamatához. Sikerült igazolnunk, hogy az emlős mirtronok érése is szigorúan a splicing folyamatához kötődött, ugyanis az 5' illesztési pontban mutációt hordozó konstrukciókból nem képződtek miRNS-ek (**3. ábra**). Ezek alapján úgy tűnt, hogy valódi humán mirtronokat azonosítottunk, azonban egy bizonyításra még szükség volt: megvizsgáltuk a mirtronok, illetve kontrollként kanonikus miRNS-ek érését DGCR8-deficiens sejtekben. Ilyen emlős sejtekben igazoltuk, hogy míg a kanonikus miRNS-t (pl. a hsa-miR-33b-t) kifejező konstrukciók itt nem működnek, az igazolt mirtron szekvenciákból (pl. a hsa-miR-877) érett, funkcionális miRNS-ek képződnek. Ezekkel a kísérletekkel bebizonyítottuk, hogy az emberi genomban is léteznek valódi mirtronok, amelyekről alternatív útvonalon, a Drosha/DGCR8 komplextől függetlenül, a splicing folyamatának felhasználásával indul el a lókuszon kódolt miRNS-ek érése. Ugyanakkor ezen munkáink fontos tanulsága volt, hogy nem minden rövid intronban elhelyezkedő miRNS viselkedik mirtronként (az általunk vizsgált hsa-miR-1233 például nem), és az adott lókuszt vizsgálata mindenképpen biokémiai/molekuláris biológiai bizonyítást igényel (Schamberger és mtsai, 2012; Schamberger és Orban, 2014b).

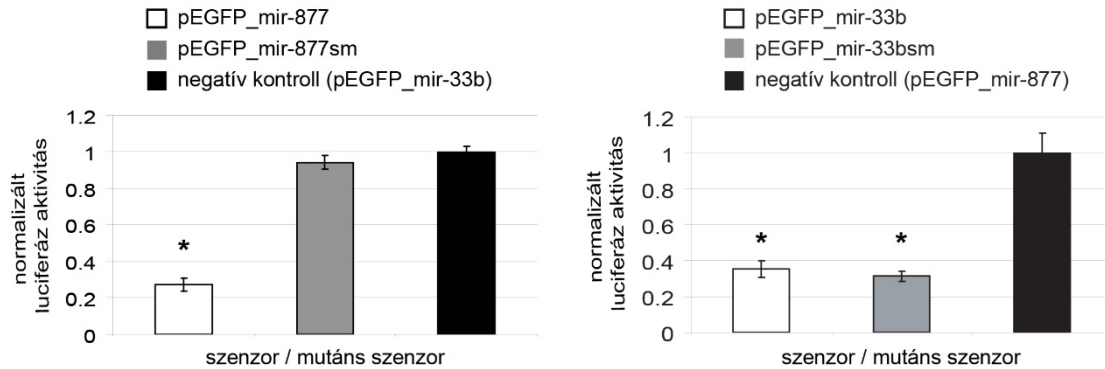
A - riporter konstrukciók



B - splicing vizsgálatok



C - miRNS aktivitás mérése



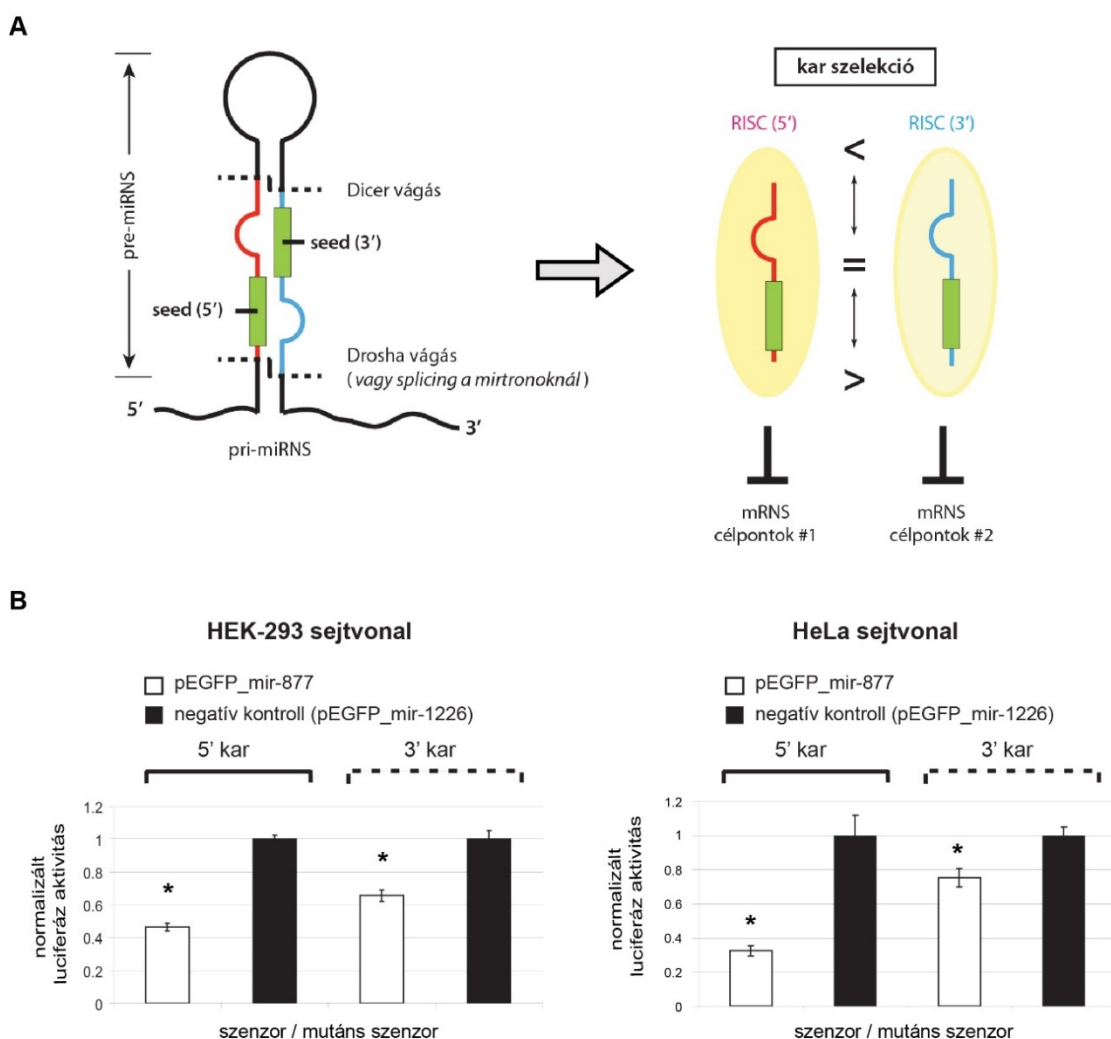
3. ábra: Egy mirtron (*hsa-miR-877*) és egy kanonikus *miRNS* (*hsa-miR-33b*) összehasonlító vizsgálata *HEK-293* sejtekben. (A) A riporter konstrukciók szerkezete. (B) A működő splicing indikátora az EGFP fluoreszcencia, amely a splicing mutánsok (sm) esetében nem detektálható. (C) Az érett, működő *miRNS*-t a luciferáz szenzor aktivitásának csökkenése jelzi. A mirtron esetében a splicing mutáns konstrukciókról nem képződik érett *miRNS*. *: $p < 0,05$.

3.1.3. Változatok egy lókusztól: miRNS karhasználat és a 3' izomiR-ek

A humán mirtronok vizsgálata kapcsán merült fel először a kérdés, hogy a funkcionális tesztelés során egy adott lókusznál a pre-miRNS melyik karjából, az 5' vagy a 3' karból érő potenciális miRNS-t vizsgáljuk. A tudomány korábbi állása szerint minden miRNS lókusznál esetén dominánsan az egyik karból képződik funkcionális termék, a másik szál pedig a RISC érése során eliminálódik (Khvorova és mtsai, 2003; Schwarz és mtsai, 2003). Későbbi vizsgálatok viszont arra utaltak, hogy a miRNS-ek érésének ezen lépése is meglehetősen bonyolult szabályozás alatt áll, amely végső soron növeli a miRNS lókusztól képződő szabályozó kisRNS-ek repertoárját (**4A ábra**). Ezekre az eredményekre alapozva úgy döntöttünk, hogy a funkcionális teszteket minden miRNS esetében az 5' és a 3' karra is egyaránt elvégezzük. Ez a megközelítés nagyon szerencsésnek bizonyult, ugyanis a hsa-miR-877 esetében például sikerült igazolnunk, hogy több sejttípusban mind az 5', mind pedig a 3' karból származó érett miRNS-ek egyszerre vannak jelen az effektor komplexekben (**4B ábra**). Kísérletes eredményeink így elsők között mutatták be egy miRNS lókuszon az aktív karhasználat szabályozásának több sejttípusban elvégzett szisztematikus vizsgálatát. Az eredmények a szakterületünkön nagy érdeklődést váltottak ki, és a közleményünket elfogadó folyóirat aktuális számában az erről szóló ábránk a címlapra került (Schamberger és mtsai, 2012).

A miRNS-ek célzott kimutatása és szekvenciális validálása vezetett el minket egy másik izgalmas, és korábban kevésbé ismert területre, az érett miRNS molekulák végeinek szekvenciális heterogenitásához. A miRNS-ek esetében az új generációs szekvenálási adatok rávilágítottak arra, hogy itt az adott lókusztól sok esetben egy miRNS populáció képződik, amelyben 5' és 3' szekvencia variánsok, izomiR-ek vannak jelen (Burroughs és mtsai, 2011; Neilsen és mtsai, 2012; Zhou és mtsai, 2012). Ezek sok esetben 1-2 nukleotid különbséget jelentenek a fő izomiR-hez képest, de előfordulnak a végükön jóval nagyobb hosszúságban különböző variánsok is. Funkcionális szempontból az izomiR-eknek azért is van jelentősége, mert a miRNS-ek a célpont felismerése során sokszor csak az 5' végük egy részén, a 2-8. nukleotid által meghatározott magi régióban (*seed sequence*, **4A ábra**) mutatnak komplementaritást az mRNS szekvenciával, így az 5' végükön hosszabb izomiR-eknél változhat a célpont specifikációja. Az általunk végzett vizsgálatokban az izomiR-ek jelenléte technikai szempontból jelentett kihívást: amíg a *Northern* analízis esetén (megfelelő expressziós szint mellett) az izomiR-ek egyértelműen azonosíthatók, addig az expresszió mérésére szintén általánosan elterjedt *real-time* PCR módszer esetében a szekvencia

heterogenitása komolyan befolyásolhatja a megbízhatóságot. Több miRNS lókuszt esetében megmutattuk, hogy a különféle izomiR-ekre tervezett *real-time* PCR esszék nem specifikusak, ezért nem lehet az adott izomiR-ek mennyiségét ilyen módszerekkel megbízhatóan kvantitálni (Schamberger és Orban, 2014a). Az általunk is leírt problémára azóta születtek áthidaló megoldások, így ma már több módszer is létezik, amelyek alkalmasak az izomiR-ek pontosabb mérésére (Honda és Kirino, 2015; Wang és mtsai, 2020; Franco és mtsai, 2022). A jelenség részletesebb megismerése ugyanakkor rávilágított a „nem-kódoló” gének képződésének sokszínűségére, amelyek populációs-, vagy akár egyedi-szintű különbségekkel lehetővé teszik a génexpressziós szabályozás nagyon összetett „finomhangolását” (Orban, 2023).



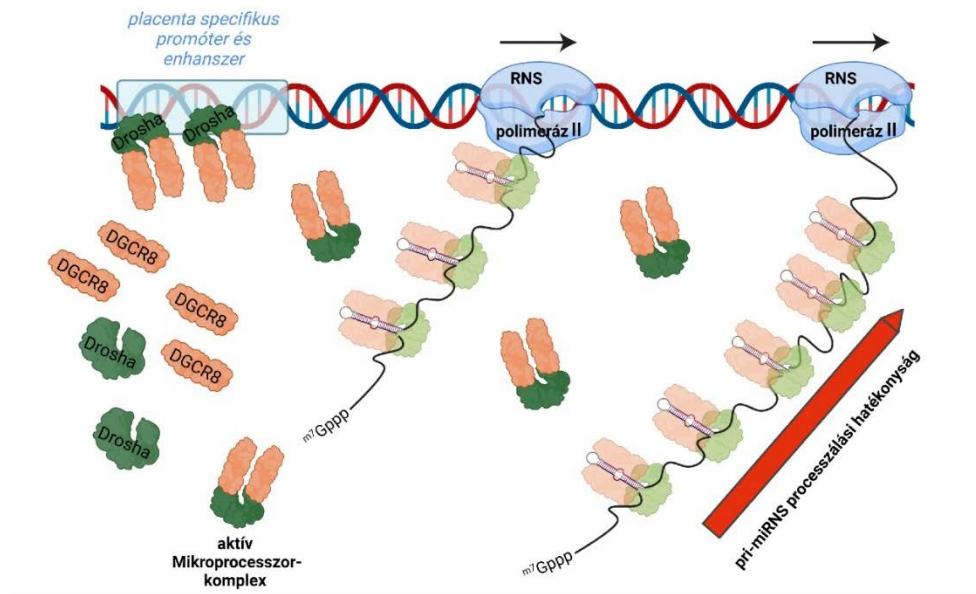
4. ábra: A pre-miRNS karok közötti szelekció szerepének vizsgálata. (A) A pre-miRNS általános szerkezete és a karválasztás egyszerűsített modellje. Adott sejt típusokban eltérő arányban képződhetnek 5' vagy 3' eredetű csendesítési komplexek (RISC-ek). (B) A mirtron eredetű hsa-miR-877 miRNS karhasználatának funkcionális vizsgálata luciferáz esszékkel. A sejtekben egyszerre vannak jelen az 5' vagy a 3' karból ért miRNS-t tartalmazó RISC-ek. *: $p < 0,05$.

3.1.4. miRNS-ek klaszterekben

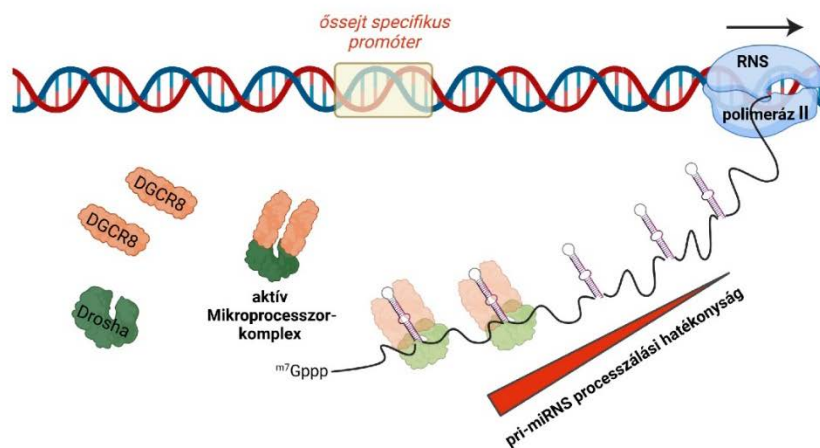
A miRNS gének esetében gyakran előfordul, hogy több miRNS egy közös klasztert alkotva együttes szabályozás alatt áll (Altuvia és mtsai, 2005; Kim és Kim, 2007; Ramalingam és mtsai, 2014; Gebert és MacRae, 2019). Az ilyen klaszterekben legtöbbször kevés számú (<10) miRNS található, extrém esetekben azonban akár 40-50 miRNS lókuszt is egy közös transzkripció egységet alkothat, amelynek evolúciós előnye, hogy nagyszámú regulátort lehet egyszerre „mozgósítani”, ugyanakkor poszttranszkripció mechanizmusok továbbra is lehetővé teszik a közös klaszterből átíródott miRNS-ek individuális finomhangolását (Kim és mtsai, 2009; Michlewski és Caceres, 2019). Kutatásaink során a 19. humán kromoszómán található miRNS klaszter (C19MC) regulációjával foglalkoztunk részletesen, mert ez a 46 miRNS lókuszt tömörítő régió több szempontból is felkeltette az érdeklődésünket. A nagyméretű (>100 kilobázis szekvenciát lefedő) kromoszómarégió szövetspecifikus expressziót mutat: kifejeződik embrionális őssejtekben és trofoblaszt sejtekben, illetve jelentős mértékben placenta sejtekben, más szövetekben azonban (néhány tumor kivételével) nem lehet kimutatni a transzkripcióját (Bar és mtsai, 2008; Ren és mtsai, 2009; Flor és Bullerdiek, 2012). A lókusztól egy nagyon hosszú transzkriptum íródik át, amely komplex splicing mintázatot is mutat, ugyanakkor fehérjekódoló részeket a mai napig nem sikerült benne kimutatni, és úgy tűnik, hogy ez a régió „tisztán” nem-kódoló elemek, miRNS-ek és Alu szekvenciák forrása (Bortolin-Cavaille és mtsai, 2009). Vizsgálataink első izgalmas eredményét az embrionális őssejtek és a placentaszövet összehasonlító expressziós vizsgálatai hozták. Kiderült, hogy placentában jóval magasabb a C19MC expressziója, az őssejtekben ugyanakkor az alacsony expresszió mellett a miRNS-ek szintje a klaszter 3' irányába egy erőteljes, pozíció függő fokozatos csökkenést mutat. A jelenség részletes molekuláris vizsgálata során sikerült kimutatni, hogy a placenta sejtekben működő enhanszer régiók képesek a Drosha fehérje hatékony toborzására, ezáltal jelentősen megnövelve a Mikroprocesszor-komplex lokális koncentrációját. Ehhez hasonló, úgynevezett „szuper-enhanszer” régiókhöz kötődő mechanizmust más lókusztok esetén korábban már leírtak, amelynek kapcsán a promoternél összeálló Drosha/DGCR8 komplex az RNS polimeráz holoenzimhez kötődve ko-transzkripcionális módon elősegítheti a pre-miRNS-ek kivágódását (Suzuki és mtsai, 2017). Az eredmények alapján azt feltételezzük, hogy a vizsgált miRNS-klaszter placenta-specifikus promotere az őssejtekben működő alternatív promoterral szemben nemcsak a magasabb szintű transzkripcióhoz, hanem a Mikroprocesszor-komplex hatékony „toborzásán” keresztül a nagyszámú miRNS hatékonyéréséhez is jelentősen hozzájárul (**5. ábra**) (Fothi és mtsai, 2021).

A mechanizmus részleteivel kapcsolatban természetesen még akadnak tisztázandó kérdések, például a komplex másik tagjának, a DGCR8 fehérjének a szerepe a Drosha „toborzásában” (Ree és mtsai, 2022). Ennek az újszerű mechanizmusnak a tanulmányozása, és a klaszterről átíródó miRNS-ek vizsgálata ugyanakkor orvosbiológiai jelentőséggel is bír, hiszen közelebb vihet minket a kóros placentaműködésre visszavezethető betegségek modern, genetikai alapú diagnózisához, és az ezeken alapuló jövőbeli gyógyításhoz is (Biro és mtsai, 2019).

A - a Mikroprocesszor-komplex toborzása és működése placenta sejtekben



B - a Mikroprocesszor-komplex toborzása és működése embrionális őssejtekben



5. ábra: A C19MC miRNS-ek feldolgozási mechanizmusának az eredményeink alapján felállított modellje. A placenta-specifikus promóter (A) hatékonyan képes a Drosha fehérjén keresztül toborozni a Mikroprocesszor-komplexeiket, amelyek így a klaszter teljes hosszában hatékonyan működnek, szemben az embrionális őssejtekben működő promóterrel (B).

Az ábra a *biorender.com* alkalmazással készült.

3.2. Mobilis genetikai elemek – genomi szerepük és felhasználásuk

3.2.1. *piggyBac*-szerű elemek a humán genomban

Egyes genomokban a transzpozonok meglepően nagy arányban vannak jelen: az emberi genom legalább 45%-a transzpozon eredetű, a kukorica genomjában ez a szám 85% (Wells és Feschotte, 2020)! Nagy kérdés persze, hogy ezeknek vajon mekkora hányada aktív transzpozon, de ezzel együtt mégis hogyan lehetséges az, hogy ilyen nagyszámú invazív elem mellett a genom látszólag jól működik? A kérdés azért is zavarba ejtő, hiszen kezdetben a transzpozonokra alapvetően mint genomi parazitákra gondoltak: ők a tipikus megtestesítői a Richard Dawkins által elnevezett „önző génnek”-nek (Dawkins, 2021). Számos példát ismerünk azonban a molekuláris „domesztikáció” jelenségére, amelynek során az inaktiválódott transzpozonok a gazdagenom aktív részeseivé, fehérje és/vagy RNS gének forrásává váltak (Jangam és mtsai, 2017). A jelenséget kutatva kutatócsoportunk a *piggyBac* szupercsalád tagjait kezdte el vizsgálni (**6. ábra**), amelynek első képviselőjét a *Trichoplusia ni* nevű lepkefajban azonosították, később azonban a szupercsalád több képviselőjét az egysejtűektől a primátákig számos élőlényben, így emberben is megtalálták (Fraser és mtsai, 1983; Bouallegue és mtsai, 2017). Ezekre alapozva kutatásaink során azt tűztük ki célul, hogy az összes humán PGBD fehérje szisztematikus vizsgálatával igyekszünk feltérképezni a *piggyBac* transzpozonok evolúcióját az emberi genomban, és választ kapni arra, hogy ezek vajon jelenleg is aktív mobilis elemek, vagy inkább már domesztikálódott „rezidens” fehérjékként működnek. A kérdés azért is érdekes, hiszen a *piggyBac* transzpozonos génbevitt széles körben alkalmazzák, így kiemelten fontos megvizsgálni, hogy a rovar alapú rendszer képes-e bármilyen keresztreakcióra a humán elemekkel.



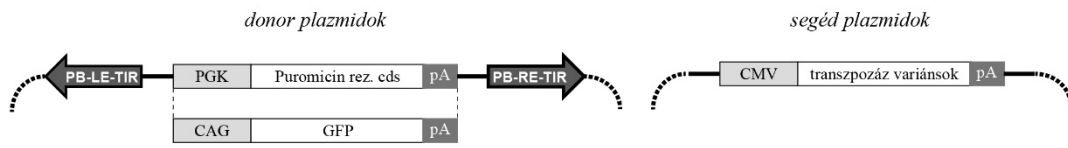
6. ábra: A természetes *piggyBac* transzpozon szerkezete. A transzpozázt kódoló transzkripció egységet határoló terminális szekvenciák ugyan eltérő hosszúságúak (a LE-TIR hosszabb), de mindkét TIR szekvenciában megtalálható egy belső és egy külső repetitív szekvenciaelem, ellentétes orientációban.

A vizsgálatok első lépéseként megmutattuk, hogy a transzpozáz eredetű humán PGBD gének expressziós mintázatai markáns, de egymástól eltérő szövetspecifikus expressziót mutatnak. A PGBD3 például egy természetes „géncsapdaként” a *Cockayne Syndrome group B* (CSB) gén 5. intronjában helyezkedik el, és a lókuszt egy komplex alternatív splicing mintázatot mutat (Newman és mtsai, 2008). Az általunk erre a régióra speciálisan kifejlesztett *real-time* PCR esszé (Kolacsek és mtsai, 2017) segítségével igazoltuk, hogy a splicing variánsok expressziós szintje szövetspecifikus mintázatot mutat, amely aktív szabályozásra, és fontos endogén regulációs szerepre utal. Az expressziós mintázatok mellett a főemlősökön belül a PGBD fehérjék evolúciós konzerváltságát a Ka/Ks analízis segítségével is megvizsgáltuk, az eredmények pedig azt támasztották alá, hogy a PGBD géneknek fontos endogén funkcióik lehetnek, amelyek feltérképezése további vizsgálatokat igényel (Kolacsek és mtsai, 2022).

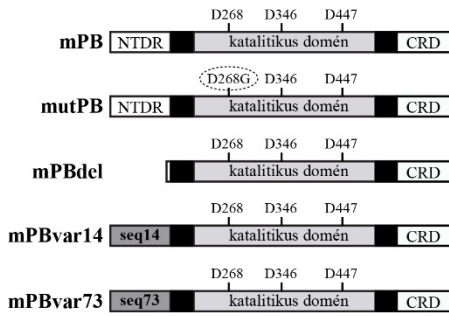
A következő lépésben egy átfogó analízissel szeretnénk tisztázni, hogy bármelyik *piggyBac*-eredetű humán szekvencia megőrizte-e a transzpozíciós képességét. A vizsgálatokat egy kétkomponensű, antibiotikum rezisztencián alapú szelekciós rendszerben végeztük, amelynek keretében bizonyítottuk, hogy a humán PGBD elemek egyike sem képes már a transzpozíció első lépésére, a szubsztrát kivágására sem (**7. ábra**). További vizsgálataink során különféle stresszhatásoknak kitett sejtekben, így hipoxiás állapotban, KBrO₃-tal kiváltott oxidatív stressz, illetve az UV kezelés indukálta stresszfolyamat során vizsgáltuk a humán PGBD-k expresszióját. Eredményeink mindegyik PGBD fehérje esetében egymástól eltérő és sejtípustól függő mintázatot mutattak, amely arra utal, hogy a humán PGBD fehérjék endogén funkciókra domesztikálódtak. Az expressziós vizsgálatok ugyanakkor arra is rávilágítottak, hogy különböző PGBD fehérjék valószínűleg eltérő szereppel bírnak, így a működésük megértéséhez mindegyiküket egyedileg kell vizsgálni (Kolacsek és mtsai, 2022). A jelenleg is folyó ilyen irányú kutatásaink első izgalmas eredményét Izsvák Zsuzsanna kutatócsoportjával közösen publikáltuk, amelyben igazoltuk, hogy a PGBD1 fehérje a NEAT1 hosszú nem-kódoló RNS regulációján keresztül szabályozza a sejtmagi „*paraspeckle*” struktúrák kialakulását, és ezen keresztül a neuronális progenitor sejtek differenciációját (Rasko és mtsai, 2022). Ezek az érdekes és újszerű eredmények rávilágítottak arra, hogy az emberi evolúció során bizonyos transzpozonok a domesztikációjuk során jelentős mértékben hozzájárultak új endogén funkciók kialakulásához, amelyek akár új sejtstruktúrák kialakulásának a molekuláris hátterét is biztosíthatják.

mtsai, 2020). Úgy döntöttünk, hogy részletes vizsgálatokkal igyekszünk feltárni az NTDR szerepét a transzpozíció során. A vizsgálatokhoz létrehoztuk a rovar *piggyBac* transzpozáz emlős rendszerekre kodon-optimalizált variánsának (mPB) többféle mutáns változatát. Az mPBdel esetében a fehérjéből eltávolítottuk az NTDR-nek prediktált első 100 aminosavat, illetve létrehoztunk több „*scrambled*” variánst, amelyek az NTDR-t alkotó összes aminosavat összekeverve tartalmazták úgy, hogy a régió rendezetlen karakterisztikája megmaradt (mPBvar14 és mPBvar73 variánsok, **8. ábra**). Ezekre azért volt szükség, mert lényeges kérdés volt, hogy a funkció szempontjából vajon csak a régió rendezetlen volta, vagy az NTDR szekvenciája is egyaránt fontos szereppel bír. A létrehozott transzpozáz variánsokat a már korábban ismertetett kétkomponensű tesztrendszerben vizsgálva kimutattuk, hogy mindegyik mutáns esetében a transzpozíció excíziós lépése megtörténik, bár az alkalmazott diagnosztikus (nem kvantitatív) PCR a reakció hatékonyságáról nem ad információt (**8C ábra**). Az antibiotikum szelekción alapuló kolónia esszék viszont azt mutatták, hogy a transzpozíció az NTDR hiányos mPBdel transzpozáz esetében szignifikánsan kisebb hatékonysággal, a HEK-293 sejtvonal esetében közel 40%-kal csökkent mértékben megy végbe (**8D ábra**). Fontos eredmény volt továbbá, hogy a kevert mutánsok a fenotípust nem komplementálták, sőt inkább tovább csökkentették a transzpozíció hatékonyságát (**8D ábra**). A vizsgálatokat két másik sejtvonalon (HeLa és MCF-7) is elvégezve azt tapasztaltuk, hogy az NTDR deléció mindenhol a transzpozíciós hatékonyság csökkenéséhez vezet, de ennek a mértéke erősen függ a sejttypustól. Egy speciális, Ivics Zoltán laboratóriumából származó riporter sejtvonalon azt is sikerült igazolni, hogy az NTDR szerepe nagyrészt a transzpozíció excíziós lépésének a modulálásában van, az integrációs lépést már kevésbé befolyásolja. Az eredmények arra utaltak, hogy a *piggyBac* transzpozáz NTDR szegmense pozitív módon befolyásolja a transzpozíciót, és a rendezetlenség mellett ebben fontos szerepe lehet a régió szekvenciájának is. Feltételeztük, hogy a transzpozíció ilyen fajta „finomhangolása” az NTDR más fehérjékkel történő interakcióján keresztül valósulhat meg, és ezek sejt-specifikus expressziós szintje vagy elérhetősége magyarázhatja az általunk tapasztalt sejttypus függő mintázatot. Végezetül a *piggyBac* szuperfamilia tagjainak bioinformatikai vizsgálatával azt is igazoltuk, hogy az NTDR szegmens a legtöbb ilyen transzpozáz eredetű fehérjében megtalálható, így transzpozícióra nem képes, domesztikálódott fehérjék működésében is fontos szerepe lehet (Wachtl és mtsai, 2022).

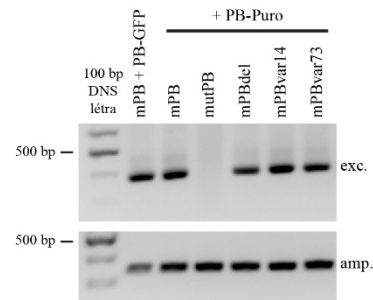
A - a transzpozon esszékhöz használt plazmidok szerkezete



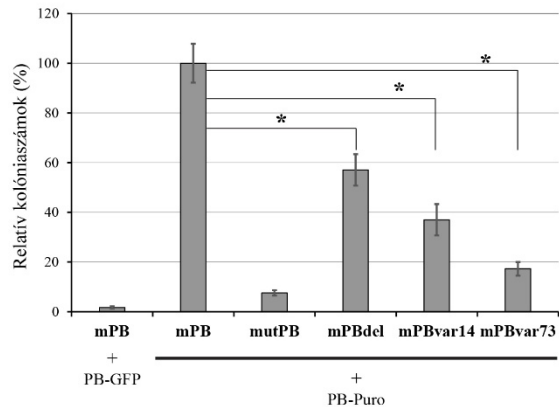
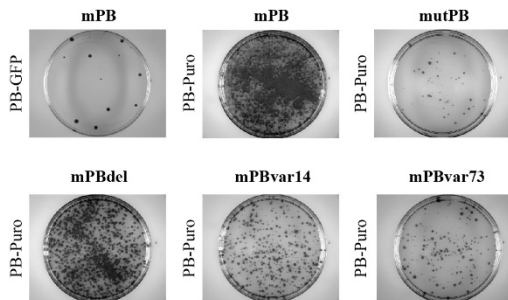
B - a piggyBac transzpozáz (mPB) variánsok szerkezete



C - excíziós vizsgálatok HEK-293 sejteken



D - kolónia esszék HEK-293 sejteken



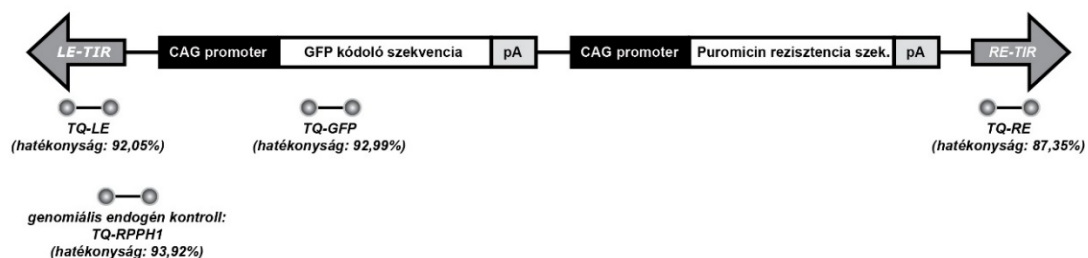
8. ábra: piggyBac transzpozáz mutánsok tesztelése HEK-293 sejteken. (A) A kétkomponensű tesztrendszerben használt plazmidok szerkezete. CAG: citomegalovírus-aktin-globin mesterséges hibrid promóter; rez.: rezisztencia. (B) A mutáns transzpozáz fehérjék sematikus szerkezete. A katalitikus domén DDD-motívumát alkotó aminosavakat a rajzok felett külön jeleztük; a fekete téglalapok a „dimerizációs és DNS-kötő domén” két elválasztott részét jelölik. NTDR: N-terminális rendezetlen régió; CRD: ciszteinben gazdag domén; seq14/seq73: az N-terminálison kevert szekvenciát tartalmazó variánsok (magyarázat a szövegben). (C) A transzpozon excíziót kimutató reprezentatív PCR eredmény. exc.: az excízióra specifikus PCR termék (381 bp); amp.: kontroll PCR termék (340 bp). (D) A kolónia esszék reprezentatív eredményei és kvantitálásuk. Minden érték az „mPB+PB-Puro” reakció esetén kapott értékre (100%) normalizált átlagot jelent, a hibázászlók szórást jelölnek. *: $p < 0,05$.

3.2.3. A transzpozon alapú rendszerek tulajdonságai – a kópiaszám pontos meghatározása

A molekuláris genetika fejlődése szükségszerűen igényelte olyan technológiák kifejlesztését, amelyek segítségével gyorsan és hatékonyan lehetett különféle modellorganizmusok genetikai állományát manipulálni. Az elterjedten használt virális rendszerek mellett a DNS transzpozonok egy lehetséges és hatékony alternatívát jelentenek, igaz, a sejtekbe való bejuttatásuk sokszor technikai kihívást jelent (Ivics és Izsvak, 2006). A gerinceseken, köztük az emberi sejteken történő alkalmazásukat azonban sokáig hátráltatta az a tény, hogy nem volt ismert az ezekben a genomokban is aktívan működő DNS transzpozon. Egy magyar házaspár, Izsvák Zsuzsanna és Ivics Zoltán korszakalkotó munkájával azonban ez megváltozott: a kutatópáros „felélesztett” egy inaktív transzpozont, amely működőképesnek bizonyult gerincesek sejtjeiben, köztük emberi eredetű sejtekben is (Ivics és mtsai, 1997). Az „életre csókoltt” transzpozon a „Csipkerózsika” (*Sleeping Beauty*) nevet kapta, és egy csapásra forradalmasította nemcsak a génbeviteli eljárásokat, hanem az erre épülő génterápiás fejlesztési irányokat is (Hudecek és mtsai, 2017). A különféle sejtípusokban és céllal történő alkalmazásuk kapcsán a transzpozonos rendszerek azonban továbbra is folyamatos fejlesztést igényelnek. Az elmúlt években kutatócsoportommal ehhez kapcsolódóan aktívan hozzájárultunk a különféle transzpozonos rendszerek fejlesztéséhez, illetve erre építve új transzgenikus modellrendszereket hoztunk létre.

A transzgenezisre használt vektorrendszerek esetében fontos kritérium, hogy amennyiben a transzgén tartósan beépülésre kerül a gazdasejt genomjába, úgy ez lehetőleg alacsony kópiaszámban, és a genom működése szempontjából leginkább „semleges” régiókba történjen. A transzgenikus eljárások kapcsán számos módszerrel monitorozható a transzgének kópiaszáma, ezek azonban sokszor körülményesek és speciális reagenseket vagy felszerelést igényelnek, alkalmazásuk pedig a legtöbbször az aktuálisan használt transzgén kimutatására optimalizált, így egy újabb transzgénre vagy modellszervezetre való áttérés gyakran hosszadalmas előkísérleteket igényel. Ez a probléma a *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszer alkalmazása során a mi laboratóriumunkban is előkerült, és felmerült az igény egy gyors, az alkalmazott transzgéntől független kópiaszám meghatározási módszer kidolgozására. A TaqMan[®] technológia segítségével a *Sleeping Beauty* transzpozon jobb és bal terminális régiójára egyaránt *real-time* PCR esszéket terveztünk (**9. ábra**), és az ezek segítségével mért kópiaszámokat összehasonlítottuk a transzpozonban található GFP szekvenciára tervezett esszé általi mérések eredményeivel. Hamar kiderült, hogy szükség van még egy megbízható endogén referencia génre, amely a haploid genomban lehetőség szerint egy kópiában fordul elő: ehhez

a mások által már többször megbízhatónak talált RPPH1 gént használtuk, amely a humán RNázP enzimkomplex egyik alegységének a H1 elnevezésű RNS komponensét kódolja (Baer és mtsai, 1990). Ezekkel a technikai feltételekkel az általánosan elterjedt Δ Ct módszer segítségével megmértük a *Sleeping Beauty* transzpozon kópiaszámát transzgenikus sejtvonalakban. További problémaként merült fel azonban, hogy a pontos méréseket befolyásolja az adott sejtvonal genomiális összetétele: a sejttenyésztés során használt „közkedvelt” sejtvonalak gyakran aneuploidok, és a referencia gént tartalmazó régiók esetlegesen eltérő kópiaszáma torzíthatja a méréseket. A precíz kvantitálás érdekében ezért a vizsgálandó sejttípusokból ismert transzpozon kópiaszámú klónokat állítottunk elő, amelyeket referencia mintaként használva a $\Delta\Delta$ Ct módszer (Livak és Schmittgen, 2001) segítségével a lehető legpontosabb kópiaszám meghatározást tudtuk elérni. A módszert elsőként HEK-293 és HeLa sejtek esetén alkalmaztuk, később azonban más sejttípusokból, például humán embrionális őssejtekből, vagy patkánysejtekből is előállítottunk ismert transzpozon kópiájú klónokat. A módszer arra is alkalmas, hogy vegyes sejtpopulációk esetén megbecsüljük a sejtekben található transzgenek átlagos kópiaszámát, amely sok vizsgálat esetén elegendő információ a kísérletek további tervezéséhez. Hogy bizonyítsuk az általunk kifejlesztett eljárás megbízhatóságát, a módszerünket sikeresen teszteltük olyan, a *Sleeping Beauty* rendszerrel előállított sejtklónokon, amelyeken más módszerrel mi vagy mások korábban már megmérték a transzgenek kópiaszámát. Összességében elmondhatjuk, hogy kidolgoztunk egy megbízható, az alkalmazott transzgentől független, a *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszerre specifikus kópiaszám meghatározási módszert, amely a transzgenikus sejtek előállításának fontos lépéseként sikeresen alkalmazható adott kópiaszámú klónok azonosításához és kiválogatásához (Kolacsek és mtsai, 2011).



9. ábra: A *Sleeping Beauty* transzpozonra specifikus kópiaszám meghatározás kidolgozása.

A módszerhez használt transzpozon sematikus szerkezete, alul jelölve a transzpozonra, illetve a transzgenre specifikus esszék tapadási helyét. Legalul feltüntettük az RPPH1 génre specifikus kontroll esszét is, illetve minden esszé esetben a hatékonysági értéket. TQ: TaqMan®.

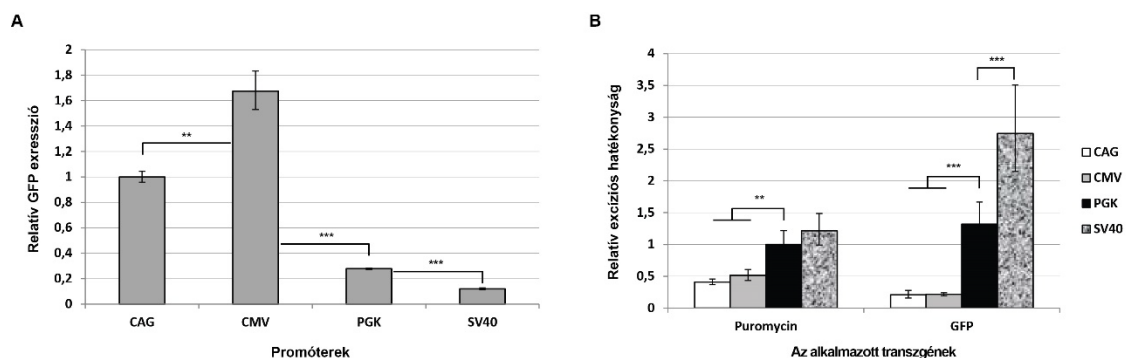
3.2.4. A transzpozon alapú rendszerek tulajdonságai – a génbevétel finomhangolása

A transzpozon alapú génbevételi rendszerek esetében is nagyon fontos kérdés, hogy mennyire rugalmasan szabályozhatók a génbevétel aspektusai különböző sejtes rendszerek esetén, vagy egy-egy adott modellsejten különféle célok elérése érdekében. A *Sleeping Beauty* rendszer esetében például az eddigi leghatékonyabb transzpozáz (az ún. „SB100X” variáns) bizonyos körülmények között az eredetileg „feltámasztott” fehérjénél százszor nagyobb aktivitást mutat, más sejtes esszéekben azonban ez az előny kevésbé kifejezett (Mates és mtsai, 2009). Felmerül a kérdés: milyen vizsgálatokkal lehet a lehető legegyszerűbben, de a lehetőségekhez képest a legmegbízhatóbban jellemezni egy transzpozáz hatékonyságát? Kísérletes rendszereink optimalizálása során ehhez kapcsolódóan azt vizsgáltuk, hogy a transzpozíció kezdeti lépésének, az excízióknak a kvantitatív jellemzése vajon mennyire ad megbízható támpontot egy transzpozáz hatékonyságának a megítélésében. A transzpozázok működését gyakran tesztelik az excízió vizsgálatával, legtöbbször egy diagnosztikus „*nested*” PCR segítségével, ez a hagyományos PCR módszer azonban önmagában nem kvantitatív. Korábbi tapasztalataink alapján ugyanakkor úgy gondoltuk, hogy a donor plazmidon található, a transzpozont határoló szekvenciákra specifikus primerek felhasználásával kifejleszthető egy olyan *real-time* PCR esszé, amely a kivágás hatékonyságát megbízhatóan méri. A transzpozáz reakció sajátossága, hogy a kivágás nem 100%-os precizitással történik, így mivel a „hátrahagyott” szekvencia nem mindig pontosan ugyanaz, a TaqMan® technológia itt nem alkalmazható megbízhatóan. A *real-time* PCR módszer ugyanakkor más módon, például a *SYBR Green* festék alkalmazásával is elvégezhető, amely esetben elegendő a célszekvenciát határoló primereket alkalmazni: az apróbb szekvenciális különbségek itt nem okoznak gondot, és a detektált szekvenciapopuláció mennyisége megbízhatóan reprezentálja a kivágás hatékonyságát. Ennek figyelembe vételével kidolgoztunk egy *real-time* PCR alapú módszert, amely alkalmas különböző transzpozázok kivágási hatékonyságának jellemzésére, de kiválóan működik egy adott transzpozáz variáns különböző körülmények között végbemenő excíziós aktivitásának monitorozására is (Kolacsek és mtsai, 2014b).

A transzpozon alapú génbevétel egyik sarkalatos kérdése a bevitt transzpozáz optimális mennyiségének a beállítása. Régről ismert ugyanis, hogy a magas transzpozáz dózis túltermeléses gátláshoz, az ún. „*overproduction inhibition*” jelenségéhez vezet: az enzimkoncentráció növelése a reakciót először telítésbe viszi, egy ponton túl azonban egyre nagyobb mértékben gátolja (Lohe és Hartl, 1996). A kétkomponensű plazmidos rendszer előnye, hogy a transzpozon és transzpozáz mennyisége több kombinációban is kipróbálható, és

kiválasztható az adott rendszerben legoptimálisabb keverési arány. A *Sleeping Beauty* és a *piggyBac* transzpozonos rendszerek ebből a szempontból történő vizsgálata érdekes eredményeket hozott: az excíziós hatékonyságot vizsgálva a korábbi eredményekkel ellentétben az SB100X transzpozáz esetében nem, míg az mPB transzpozázt vizsgálva is csak bizonyos sejtekben tudtuk kimutatni „*overproduction inhibition*” jelenségét. Az antibiotikum rezisztencián alapuló, kolónia essék segítségével mért transzpozíciós hatékonyságot vizsgálva azonban más eredményeket kaptunk. Az SB100X transzpozáz esetében a HeLa sejtekben már jelentkezett a túltermeléses gátlás, az mPB transzpozázt alkalmazva pedig minden vizsgált sejtvonalon kimutatható volt a jelenség. A túltermeléses gátlás természetesen komolyan befolyásolhatja az integrálódó transzgen kópiaszámát is: magas transzpozáz dózist alkalmazva minden általunk vizsgált transzpozáz variáns esetén a sejtpopuláción mérhető átlagos kópiaszám jelentős mértékben csökkent. Részletes vizsgálataink arra utaltak, hogy még a hiperaktív transzpozáz variánsok alkalmazása esetén is rendkívül fontos a reakciókörülmények körültekintő optimalizálása, mert a sikeres transzgenézisnek minden esetben ez a kulcsa (Kolacsek és mtsai, 2014a).

Egy másik érdekes jelésre akkor figyeltünk fel, amikor tesztelni kezdtük a transzpozonban található promóter típusát. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az erősebb transzkripció a transzpozíció hatékonyságát is befolyásolja: az SB100X rendszer használata esetén az aktívabb promóterek egyre nagyobb mértékben gátolták az excízió hatékonyságát (10. ábra).



10. ábra: A promóter aktivitás hatása a transzpozon excízióra. (A) A promóterek által kiváltott mRNS expressziós szintek vizsgálata *real-time* PCR módszerrel, GFP transzgen esetén, HEK-293 sejteken. (B) A különféle promóterekkel meghajtott transzgeneket tartalmazó transzpozonok excíziós hatékonyságának összehasonlítása *real-time* PCR módszerrel: a gyengébb promóterek esetében magasabb excíziós hatékonyságot detektáltunk. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

A jelenséget eddig csak a *Sleeping Beauty* rendszer esetében vizsgáltuk, de ennek karakterizálása más transzpozonos rendszerek alkalmazása során is indokolt lehet (Kolacsek és Orban, 2018). Összességében elmondható, hogy az ebben a fejezetben bemutatott kísérleteink rávilágítottak arra: a transzpozon alapú génbevitel nagyon sok szempontból optimalizálható, ami nemcsak a génbevitel hatékonyságát, hanem a létrehozott transzgenikus sejtek hosszú távú stabilitását is befolyásolhatja, és amely így különösen fontos a génterápiás célú alkalmazások fejlesztése során.

3.2.5. Transzgenikus sejt- és állatmodellek transzpozonokkal: a szívizomtól a patkányveséig

Az elmúlt években a *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszer segítségével számos transzgenikus sejtmodellt hoztunk létre, amely közül kétségtelenül az embrionális őssejtek módosítása jelentette a legizgalmasabb feladatot, de egyben a legnagyobb kihívást is. Amikor 2007 környékén ezekbe a kísérletekbe belefogtunk, még nem volt ismert, hogy a kiterjedt genomiális védelmi mechanizmusokkal rendelkező embrionális őssejtek vajon képesek-e gátolni egy ismeretlen DNS transzpozon, jelen esetben a *Sleeping Beauty* működését (Krishnan és mtsai, 2006; Liew és mtsai, 2007). Bebizonyítottuk, hogy ez a transzpozonos rendszer alkalmazható humán embrionális őssejteken is, illetve hosszas kísérletsorozattal kidolgoztuk erre a sejt típusra a legoptimálisabb transzgenezis feltételeit. A vizsgálatok részét képezte a megfelelő promóterek kiválasztása, aminek kapcsán igazoltuk, hogy a virális eredetű promóterek (pl. a CMV) az őssejtekben hamar csendesülnek, így a transzgének hosszú távú stabil expressziójához nem használhatók (Orbán és mtsai, 2009; Orbán és mtsai, 2011).

A transzgenikus őssejtekkel folytatott differenciációs kísérleteink érdekes hozadéka volt ugyanakkor egy olyan új megfigyelés, miszerint az általunk használt CAG promóter variáns hatására a spontán összehúzódásra képes szívizomsejtekben nagyon megemelkedett a transzgén expressziója. A GFP esetében a fluoreszcens szignál intenzitása például olyan mértékben megnőtt, hogy az ilyen típusú sejtek a tenyésztőedényben fluoreszcencia mikroszkóp nélkül, szabad szemmel is azonosíthatóak voltak. Ez azért is volt izgalmas megfigyelés, mert ezzel felfedeztünk egy „egyét fizet – kettőt kap” („*double-feature*”) típusú promótert, amely egyszerre használható a génbevitel és a transzfekciós hatékonyság ellenőrzésére (hiszen a legtöbb sejt típusban aktív), ugyanakkor az aktivitás szintje alapján bizonyos sejtek megbízhatóan elkülöníthetők más sejt típusoktól (itt például a szívizomsejtek más sejtktől). Mindenképpen szeretnénk volna a jelenség molekuláris hátterét feltárni, és első körben azt bizonyítottuk, hogy a szívizomsejtekben a CAG promóter hatására megemelkedő expresszió

lentivírusokkal létrehozott összejtklónokban is detektálható. Ezt követően igazoltuk, hogy a transzgén expressziója transzkripciós szinten kifejezetten a szívizomsejtekben emelkedik meg, és feltártuk az alkalmazott CAG promóter ezért felelős szekvenciális részleteit. Eredményeink egyértelműen igazolták a CAG promóter kettős tulajdonságát: egyfajta konstitutív promóterként minden sejt típusban működik, de kifejezetten erős aktivitást mutat szívizomsejtekben, így azok ezen promóter aktivitása alapján megbízhatóan elkülöníthetők más sejtektől. A CAG promóter ezen karakterisztikáját tovább erősítette, hogy a jelenséget humán eredetű sejtek mellett a későbbiekben egér embrionális összejtekből differenciált szívizomsejteken is sikerült igazolni (Orban és mtsai, 2009). A jelenség orvosi biológiai szempontból is fontosnak bizonyult, amit az is bizonyít, hogy a szívizomsejtek ezen módszerrel történő izolálására beadott szabadalmi igényünket Európában elfogadták (az európai regionális fázis alapszáma: *EP 08839475.4*)

Az elmúlt évtizedben a transzpozonos rendszerek segítségével nem csak transzgenikus sejt vonalakat, hanem különféle transzgenikus állatmodelleket is sikerült előállítanunk. Ezek közül mindenképp kiemelném azt a farmakológiai kutatási célokra létrehozott patkányvonalat, amely homozigóta formában minden sejtjében hordozza a GCaMP2 elnevezésű fluoreszcens kalcium szenzorfehérje génjét (Nakai és mtsai, 2001; Tallini és mtsai, 2006). A vonal egyedein többféle szöveti működéshez kapcsolódó élettani és farmakológiai vizsgálatsorozatot végeztünk: teszteltük például különféle hatóanyagok kardiovaszkuláris mellékhatásait (Szebenyi és mtsai, 2015b), elemeztük a szív működés hemodinamikai jellemzőit (Olah és mtsai, 2019), illetve a GCaMP2 kalciumszensor segítségével vizsgáltuk a májsejtek toxikológiai működését (Jemnitz és mtsai, 2017), vagy az idegrendszerben az asztrociták szinkronizációját (Szabo és mtsai, 2017). Nem utolsósorban pedig ezen az állatmodellen sikerült bizonyítani, hogy a veseszövetben egy adott időben a proximális tubulusok csak egy része végez aktív szűrést, és ezeket a sejteket magasabb citoplazmatikus kalcium szintje miatt a GCaMP2 szenzor rendszerrel vizualizálni lehet (Szebenyi és mtsai, 2015a).

4. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A doktori értekezésemben bemutatott eredményeket két főbb kutatási téma, az RNS interferencia, illetve a DNS transzpozonok működése köré lehet csoportosítani, és a kutatásaim eredményeit a következő pontokban lehet összefoglalni:

1. Hozzájárultunk az RNS interferencia folyamatainak pontosabb megértéséhez, a molekuláris mechanizmusok részleteinek feltárásához, ezen belül:

- 1 Leírtuk az siRNS útvonal által kijelölt mRNA molekulák degradációs mechanizmusát. Igazoltuk, hogy a RISC által kiváltott endonukleolitikus hasítást követően az 5' intermediert a Ski-komplex segítségével az exoszóma-komplex bontja le, míg a 3' intermediert degradációját az Xrn1 fehérje végzi el. Ez a mechanizmus később általánosnak bizonyult minden genetikai modellrendszer esetében.
- 2 Részletesen vizsgáltuk egy alternatív útvonalon érő miRNS csoport, a mirtronok képződésének molekuláris részleteit. Ezen miRNS-ek prekursorai más gének rövid intronjaként találhatóak meg a genomban, és az érésük kezdeti lépését a splicing apparátus végzi („Drosha-független” miRNS-ek). Más kutatócsoportokkal egy időben igazoltuk, hogy a mirtron útvonal létezik emlős rendszerekben is, de felhívtuk a figyelmet a bioinformatikai predikció elégtelen voltára, és a kísérletes validálás szükségességére.
- 3 Igazoltuk, hogy a miRNS gének terméke a kezdeti elképzelésekkel szemben nem egy diszkrét RNS molekula, hanem egy komplex kisRNS populáció. Az érési folyamatokban fontos szerepe van az 5' vagy a 3' kar kiválasztásának, és az izomiR-ek képződésének, és igazoltuk, hogy ezek pontos kvantitálása komoly technikai kihívást jelent.
- 4 Megmutattuk, hogy a klaszterekben elhelyezkedő miRNS-ek érését speciális tényezők befolyásolják. Az egyedi miRNS-ekre ható faktorok mellett a Mikroprocesszor-komplex komponenseinek a lokális koncentrációja limitáló tényező lehet, és a klaszterről képződő miRNS-ek szekvenciális sorrendjének megfelelő kisRNS mennyiségi grádiens kialakulását, egyfajta pozíció hatást eredményezhet.

2. Részletesen vizsgáltuk a DNS transzpozonok működését és evolúcióját, ezen belül:

- 1 Szisztematikus vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a humán genomban található *piggyBac*-eredetű fehérjék (PGBD1-5) nem képesek transzpozícióra, és már endogén funkciókra domesztikálódtak. A rovar *piggyBac* fehérje N-terminális rendezetlen

régiójáról megmutattuk, hogy részt vesz a transzpozíció finomhangolásában, és főleg a transzpozíció excíziós lépésére van jelentős hatással. Mivel az N-terminális rendezetlen régió a *piggyBac* szupercsalád képviselőinek túlnyomó többségében megtalálható, ezért feltételezzük, hogy a domesztikált fehérjék szabályozásában is jelentős szerepe lehet.

- ② A *piggyBac* és a *Sleeping Beauty* rendszerek részletes vizsgálatával behatóan elemeztük a transzpozon alapú génbevétel tulajdonságait, és többféle sejtes rendszerben meghatároztuk a hatékony transzgenézis optimális paramétereit. Kidolgoztunk olyan *real-time* PCR alapú módszereket, amelyekkel a beépült transzpozonok kópiaszáma, illetve a transzpozíció excíziós lépésének hatékonysága nagyon pontosan kvantitálható.
- ③ Az általunk optimalizált *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszerrel sokféle sejt- és állatmodellt hoztunk létre. Ezek közül komoly kihívást jelentett a humán embrionális őssejtvonalak módosításának kidolgozása, amelynek izgalmas „melléktermékeként” azonosítottunk egy szokatlan tulajdonságú, ún. „*double-feature*” promótert. Ez a CAG konstitutív promóterként a génbevétel indikátoraként is használható, ugyanakkor a szívizomsejtekben tapasztalható erős aktivitását felhasználva ezen sejtípusok megbízhatóan elkülöníthetők más sejtektől. Az általunk létrehozott transzgenikus állatmodellek közül kiemelendő a GCaMP2 kalcium szenzorfehérjét kifejező patkányvonal, amely kifejezetten alkalmas a szívizom-, illetve a vesesejtek élettani és farmakológiai vizsgálatára.

A doktori értekezésemben bemutatott eredmények közös metszetét a genom „nem-kódoló” titulált elemei jelentik – ez a definíció azonban lassan kezd idejétmúlttá válni. Ahogy egyre többet tárunk fel genomunk titkaiból, úgy kezdik lassan a „nem-kódoló” gének szárosságban is felülmúlni a fehérjekódoló géneket. Ugyanakkor egyre világosabbá válik, hogy ezekre az általunk generált mesterséges kategóriákra nem független entitásokként kell tekintenünk, hiszen ezek összehangolt működése tette lehetővé a minket körülvevő élőlények végtelen változatosságát. A kódoló és nem-kódoló szekvenciák pazar összjátékának az egyik legszebb példái éppen a transzpozonok, ahol a transzpozáz fehérjék a repetitív DNS szakaszokkal együttesen képesek egyfajta parazita viselkedésre, másrészt viszont pozitív módon is képesek hozzájárulni a genomok fejlődéséhez. Külön öröm számomra, hogy az RNS alapú szabályozási mechanizmusok feltárása mellett a mobilis genetikai elemek molekuláris vizsgálatával együtt bepillantottam a genomok, azok között is az emberi genom evolúciójának eddig ismeretlen rétegeibe, és a tudományos pályám még előttem álló részében is arra fogok törekedni, hogy ezt az izgalmas utazást tovább folytassam.

5. AZ ALKALMAZOTT METODIKÁK ÁTTEKINTÉSE

A doktori értekezésemben bemutatott kutatásokban sokféle molekuláris biológiai és sejtbiológiai módszert alkalmaztunk, amelyek részletes bemutatása megtalálható a disszertáció alapját képező tudományos közleményekben. A jelen fejezetben ennél fogva csak röviden, tematikailag csoportosítva sorolom fel a fontosabb anyagokat és módszereket.

Baktérium gazdasejtként az *Escherichia coli* K12 törzsének az XL1-Blue és a DH5 α változatait használtuk, és a szokásos mikrobiológiai körülmények között tenyésztettük. A kísérleteink során alkalmazott plazmidvektorokat a hagyományos molekuláris klónozással állítottuk elő, konstrukciók végső ellenőrzése *Sanger*-szekvenálással történt.

A kísérletekben a tudományos kutatásokban általánosan elfogadott eukarióta sejtvonalatokat használtunk (HEK-293, HeLa, MCF-7, stb.), amelyeket a nemzetközi standardoknak megfelelő módszerekkel és körülmények között tenyésztettünk. A humán pluripotens őssejtvonalak fenntartását és differenciálását Apáti Ágota laboratóriumában végezték.

A transzgenikus patkányvonalak előállítása az általunk kidolgozott módszertannal történt, ennek részletei a (Szebenyi és mtsai, 2015b) közleményünkben kerültek bemutatásra.

A különféle RNS és fehérje expressziós vizsgálatokhoz az adott kísérleti rendszerre leginkább optimális módszereket alkalmaztunk (pl. *Northern* és *Western* analízist, vagy és *real-time* PCR módszereket), a nemzetközileg elfogadott módszertani ajánlások figyelembevételével. A kisRNS molekulák funkcionális vizsgálatára luciferáz-esszéket alkalmaztunk.

A DNS transzpozonok működését excíziós és kolónia esszékkel vizsgáltuk. A transzpozonok kópiaszámának pontos meghatározására kidolgozott módszerünk az erről szóló közleményünkben található meg részletesen (Kolacsek és mtsai, 2011).

A releváns kísérleteinkben használt bioinformatikai predikciókat és elemzéseket az interneten szabadon hozzáférhető platformokon és szoftverekkel végeztük, a részletek az egyes közleményekben megtalálhatók. A vizsgálatok és mérések során generált adatok statisztikai analízisei a biológiai mintákra adaptált nemzetközi ajánlások alapján készültek.

6. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

A doktori értekezésem alapját olyan, a PhD fokozat megszerzését (2003) követő években megjelent közlemények jelentik, amelyekben meghatározó (első vagy utolsó/levelező (*)) szerző vagyok. Ezek a közlemények időrendben a következők:

1. **Orban, T. I.**, and E. Izaurralde: Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 2005, 11(4):459-469.
doi: <https://doi.org/10.1261/rna.7231505>.

impakt faktor: 6,140 (D1); független idézetek száma: 269

2. **Orban, T. I.**, A. Apati, A. Nemeth, N. Varga, V. Krizsik, A. Schamberger, K. Szebenyi, Z. Erdei, G. Varady, E. Karaszi, L. Homolya, K. Nemet, E. Gocza, C. Miskey, L. Mates, Z. Ivics, Z. Izsvak, and B. Sarkadi: Applying a "double-feature" promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. *Stem Cells* 2009, 27(5):1077-1087.
doi: <https://doi.org/10.1002/stem.45>.

impakt faktor: 7,750 (D1); független idézetek száma: 25

3. Kolacsek, O., V. Krizsik, A. Schamberger, Z. Erdei, A. Apati, G. Varady, L. Mates, Z. Izsvak, Z. Ivics, B. Sarkadi, and **T. I. Orban***: Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers. *Mob DNA* 2011, 2(1):5. doi: <https://doi.org/10.1186/1759-8753-2-5>.

impakt faktor: 2,430 (Q2); független idézetek száma: 19

4. Schamberger, A., B. Sarkadi, and **T. I. Orban***: Human mirtrons can express functional microRNAs simultaneously from both arms in a flanking exon-independent manner. *RNA Biol* 2012, 9(9):1177-1185. (*cover page story*)
doi: <https://doi.org/10.4161/rna.21359>.

impakt faktor: 4,841 (Q1); független idézetek száma: 15

5. Schamberger, A., and T. I. Orban*: 3' IsomiR species and DNA contamination influence reliable quantification of microRNAs by stem-loop quantitative PCR. *PLoS One* 2014, 9(8):e106315. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106315>.

impakt faktor: 3,234 (D1); független idézetek száma: 46

6. Schamberger, A., and **T. I. Orban***: Experimental validation of predicted mammalian microRNAs of mirtron origin. *Methods Mol Biol* 2014, 1182:245-263. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1062-5_22. ; *könyvfejezet; független idézetek száma: 1*

7. Kolacsek, O., Z. Erdei, A. Apati, S. Sandor, Z. Izsvak, Z. Ivics, B. Sarkadi, and **T. I. Orban***: 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):241-252.

doi: <https://doi.org/10.1089/hgtb.2013.149>.

impakt faktor: 2,436 (Q1); független idézetek száma: 13

8. Kolacsek, O., Z. Izsvák, Z. Ivics, B. Sarkadi, and **T. I. Orbán***: 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. 2014, pages: 97-123.

impakt faktor: (könyvfejezet); független idézetek száma: -

9. Szebenyi, K., A. Furedi, O. Kolacsek, E. Pergel, Z. Bosze, B. Bender, P. Vajdovich, J. Tovari, L. Homolya, G. Szakacs, L. Heja, A. Enyedi, B. Sarkadi, A. Apati, and **T. I. Orban***: Generation of a Homozygous Transgenic Rat Strain Stably Expressing a Calcium Sensor Protein for Direct Examination of Calcium Signaling. *Sci Rep* 2015, 5:12645. doi: <https://doi.org/10.1038/srep12645>.

impakt faktor: 5,228 (D1); független idézetek száma: 3

10. Kolacsek, O., E. Pergel, N. Varga, A. Apati, and **T. I. Orban***: 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* 2017, 598:43-49. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.035>.

impakt faktor: 2,498 (Q1); független idézetek száma: 6

11. Kolacsek, O., and **T. I. Orban***: Transcription activity of transposon sequence limits Sleeping Beauty transposition. *Gene* 2018, 676:184-188.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.07.045>.

impakt faktor: 2,638 (Q1); független idézetek száma: 1

12. Fothi, A., O. Biro, Z. Erdei, A. Apati, and **T. I. Orban***: Tissue-specific and transcription-dependent mechanisms regulate primary microRNA processing efficiency of the human chromosome 19 MicroRNA cluster. *RNA Biol* 2021, 18(8):1170-1180. doi: <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1836457>.

impakt faktor: 4,766 (Q1); független idézetek száma: 6

13. Kolacsek, O., G. Wachtl, A. Fothi, A. Schamberger, S. Sandor, E. Pergel, N. Varga, T. Rasko, Z. Izsvak, A. Apati, and **T. I. Orban***: Functional indications for transposase domestications - Characterization of the human piggyBac transposase derived (PGBD) activities. *Gene* 2022, 834:146609.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146609>.

impakt faktor: 3,500 (Q2); független idézetek száma: 1

14. Wachtl, G., E. Schad, K. Huszar, A. Palazzo, Z. Ivics, A. Tantos, and **T. I. Orban***: Functional Characterization of the N-Terminal Disordered Region of the piggyBac Transposase. *Int J Mol Sci* 2022, 23(18).

doi: <https://doi.org/10.3390/ijms231810317>.

impakt faktor: 5,600 (D1); független idézetek száma: 1

15. **Orban, T. I.***: One locus, several functional RNAs-emerging roles of the mechanisms responsible for the sequence variability of microRNAs. *Biol Futur* 2023, 74(1-2):17-28. (*invited review – Special Issue: Novel Contributions to the RNA Story: Karikó's Legacy*)

doi: <https://doi.org/10.1007/s42977-023-00154-7>.

impakt faktor '22: 2,100 (Q2); független idézetek száma: 1

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A modern kori kutatások, a biológia területén különösképpen, ma már elképzelhetetlenek jó csapatmunka, és az ehhez tartozó kiváló mentorok nélkül. Ennek megfelelően én is számtalan embernek tartozom köszönettel azért, hogy eljuthattam idáig.

A posztdoktori kutatásaim meghatározó mentora volt Elisa Izaurralde, akinek a németországi laboratóriumában, a heidelbergi EMBL-ben eltöltött évek alatt, a sok nehézséggel is fűszerezett rengeteg tapasztalat kapcsán eldöntöttem, hogy a tudományos pályán szeretnék maradni. Sajnos ő pár éve már nincs közöttünk, így ennek az értekezésnek a megszületését sem érhette meg.

Tudományos karrierem és szakmai munkám során legfontosabb mentoromnak Sarkadi Balázst tartom, aki a posztdoktori kutatásaim második, magyarországi fázisától kezdődően a mai napig egyengette az utamat, és akivel a tudományos problémákat és az élet nagy kérdéseit egyaránt meg lehet vitatni. És bár mindvégig támogattott, és pontosan ismeri a kutatási projektjeinket, nekem az az érzésem, hogy a mai napig nem hisz (teljesen) az RNS-ekben...

Rengeteg köszönettel tartozom volt és jelenlegi hallgatóimnak, akik komolyan hozzájárultak tudományos sikereimhez, és saját laborvezetői képességeim csiszolásához, javításához. Hálás vagyok ezért Schamberger Anitának, Kolacsek Orsolyának, Sándor Sárának, Fóthi Ábelnek, Wachtl Gerdának és Gál Lucának (időrendben), hogy PhD hallgatóként meghatározó formálói voltak az általam vezetett labornak. Köszönöm továbbá Jordanidisz Theodórának, Pergel Enikőnek, Bolyácz Mártonnak, Tibori Kingának, Kósa Juditnak, Kerekes Péternek, Balázs Sámuelnek és Lávay Petrának, hogy MSc vagy BSc hallgatóként szintén hozzájárultak az általam vezetett szakmai munkához. Egy laboratórium működése elképzelhetetlen jó asszisztens nélkül – különösen igaz ez Némethy Kornéliára, aki fáradhatatlan lelkesedéssel és megfelelő szigorral képes kordában tartani a kísérletek lázában gyakorta elszabaduló kutatói zűrzavart. Köszönöm neki, hogy lassan egy évtizede segít megteremteni azt a stabil laborhátteret, amely nélkül a kutatásaink elképzelhetetlenek lennének. Köszönöm korábbi asszisztenseimnek, Sebestyén Zsuzsannának és Nagy Zsuzsannának, hogy odaadóan segítették a munkánkat, amikor a kezdetekben fel kellett építeni és ki kellett alakítani az akkor formálódó molekuláris biológiai laboratóriumot.

Óriási hálával tartozom „szakmai szobatársaimnak”, Apáti Ágotának és Szakács Gergelynek, hogy tudományos éleslátásukkal, kezdeményező- és segítőkészségükkel hozzájárultak közös szakmai sikereinkhez, humorukkal pedig a vidám mindennapok hangulatához. Az elmúlt évek meghatározó szakmai pezsgését köszönhetem a Sarkadi Balázs

és Váradi András által létrehozott „Biomembrán” közösségnek, ahol a két alapító mellett rengeteg szakmai és baráti kapcsolat is szövődött: közülük kiemelném Homolya Lászlót, Német Katalint, Hegedűs Tamást és Welker Ervint, akikkel rengeteg vidám szakmai időt tölthettem együtt. Köszönöm a szakmai együttműködéseket Apáti Ágota laborjából Szebényi Kornéliának, Erdei Zsuzsának és Varga Nórának, Szakács Gergely laborjából Füredi Andrásnak, illetve Welker Ervin laborjából Huszár Krisztinának. A munkánkhoz tartozó adminisztratív feladatok és a mindennapi szervezési munkák átvállalása óriási segítséget jelent, amiért őszintén hálás vagyok elsősorban Rieth Katalinnak és Lesti Juditnak, illetve Mohos Krisztinának. Köszönöm Kardos Juliannának, Buday Lászlónak és Hunyady Lászlónak, hogy intézet igazgatóként láttak bennem fantáziát, és csoportvezetőként mindig támogatták a munkámat.

Rengeteg köszönet illeti szakmai együttműködő partnereimet, akik nélkül szintén elképzelhetetlen lett volna ezen izgalmas tudományos eredmények elérése: Izsvák Zsuzsanna és Ivics Zoltán, valamint Mátés Lajos, Miskey Csaba és Krízsik Virág a transzpozonos projekteknél voltak segítségemre; Silhavy Dániellel, Várallyay Évával és Havelda Zoltánnal a kisRNS-ekhez kapcsolódó projekteknél, míg Bender Balázssal, Hoffmann Orsolyával, Gócza Elennel és Héja Lászlóval a transzgenikus patkánymodell kapcsán dolgoztunk együtt. Hálás vagyok Biró Orsolyának, Rigó Jánosnak és Than Gábor Nándornak a terhességi kórképekhez kapcsolódó RNS interferencia kutatásokhoz nyújtott segítségükért; Vellai Tibornak és Vellai-Takács Krisztinának a közös kutatásokért és a szakmai beszélgetésekért; Tantos Ágnesnek és Schád Évának pedig, hogy megnyitották előttünk a rendezetlen fehérjék izgalmas világát. Köszönöm a céges partnereinknek a sok támogatást: Hirka Gábornak a Toxi-Coop Zrt-től, Prém Péternének az Akadimpex Zrt-től, és Kacsokovics Imrének az ImmunoGenes Zrt-től. Ezúton mondok köszönetet minden szervezetnek, amelyek pénzügyileg támogatták a kutatásaimat (Magyar Tudományos Akadémia, OTKA, NKFIH, RNA Society, Eötvös Loránd Kutatási Hálózat).

A szakmai munka háttérében mindig megbújik egy támogató és önzetlen család: nagy szeretettel és hálával tartozom édesanyámnak, feleségemnek és három gyermekemnek, valamint testvéremnek, akik mindig elfogadták, sőt támogatták a kutatásaimmal járó nélkülözéseket. Azoknak a családtagoknak is köszönöm, akik a mű elkészültét sajnos már nem érhették meg.

És végezetül persze külön köszönet illeti a „nem-kódoló” RNS-eket és a transzpozonokat, amelyek nélkül sem ez a mű, sem ennek írója, de még az olvasói sem jöhettek volna létre...

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Altuvia, Y., P. Landgraf, G. Lithwick, N. Elefant, S. Pfeffer, A. Aravin, M. J. Brownstein, T. Tuschl, and H. Margalit: **Clustering and conservation patterns of human microRNAs.** *Nucleic Acids Res* 2005, 33(8):2697-2706.
- Baer, M., T. W. Nilsen, C. Costigan, and S. Altman: **Structure and transcription of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P.** *Nucleic Acids Res* 1990, 18(1):97-103.
- Bar, M., S. K. Wyman, B. R. Fritz, J. Qi, K. S. Garg, R. K. Parkin, E. M. Kroh, A. Bendoraite, P. S. Mitchell, A. M. Nelson, W. L. Ruzzo, C. Ware, J. P. Radich, R. Gentleman, H. Ruohola-Baker, and M. Tewari: **MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries.** *Stem Cells* 2008, 26(10):2496-2505.
- Berezikov, E., W. J. Chung, J. Willis, E. Cuppen, and E. C. Lai: **Mammalian mirtron genes.** *Mol Cell* 2007, 28(2):328-336.
- Biro, O., A. Fothi, B. Alasztics, B. Nagy, T. I. Orban, and J. Rigo, Jr.: **Circulating exosomal and Argonaute-bound microRNAs in preeclampsia.** *Gene* 2019, 692:138-144.
- Bortolin-Cavaille, M. L., M. Dance, M. Weber, and J. Cavaille: **C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts.** *Nucleic Acids Res* 2009, 37(10):3464-3473.
- Bouallegue, M., J. D. Rouault, A. Hua-Van, M. Makni, and P. Cappy: **Molecular Evolution of piggyBac Superfamily: From Selfishness to Domestication.** *Genome Biol Evol* 2017, 9(2):323-339.
- Burroughs, A. M., Y. Ando, M. J. de Hoon, Y. Tomaru, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, and C. O. Daub: **Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin.** *RNA Biol* 2011, 8(1):158-177.
- Chen, Q., W. Luo, R. A. Veach, A. B. Hickman, M. H. Wilson, and F. Dyda: **Structural basis of seamless excision and specific targeting by piggyBac transposase.** *Nat Commun* 2020, 11(1):3446.
- Cosby, R. L., N. C. Chang, and C. Feschotte: **Host-transposon interactions: conflict, cooperation, and cooption.** *Genes Dev* 2019, 33(17-18):1098-1116.
- Dawkins, R. 2021. Az önző gén. Kossuth Kiadó, Budapest.
- Ding, S., X. Wu, G. Li, M. Han, Y. Zhuang, and T. Xu: **Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice.** *Cell* 2005, 122(3):473-483.
- Djebali, S., C. A. Davis, A. Merkel, A. Dobin, T. Lassmann, A. Mortazavi, A. Tanzer, J. Lagarde, W. Lin, F. Schlesinger, C. Xue, G. K. Marinov, J. Khatun, B. A. Williams, C. Zaleski, J. Rozowsky, M. Roder, F. Kokocinski, R. F. Abdelhamid, T. Alioto, *et al.*: **Landscape of transcription in human cells.** *Nature* 2012, 489(7414):101-108.
- Flor, I., and J. Bullerdiel: **The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours.** *J Pathol* 2012, 227(3):270-274.
- Fothi, A., O. Biro, Z. Erdei, A. Apati, and T. I. Orban: **Tissue-specific and transcription-dependent mechanisms regulate primary microRNA processing efficiency of the human chromosome 19 MicroRNA cluster.** *RNA Biol* 2021, 18(8):1170-1180.
- Franco, S., R. Pluvinet, J. F. Sanchez-Herrero, L. Sumoy, and M. A. Martinez: **Rapid and accurate quantification of isomiRs by RT-qPCR.** *Sci Rep* 2022, 12(1):17220.
- Fraser, M. J., G. E. Smith, and M. D. Summers: **Acquisition of Host Cell DNA Sequences by Baculoviruses: Relationship Between Host DNA Insertions and FP Mutants of Autographa californica and Galleria mellonella Nuclear Polyhedrosis Viruses.** *J Virol* 1983, 47(2):287-300.
- Gebert, L. F. R., and I. J. MacRae: **Regulation of microRNA function in animals.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019, 20(1):21-37.
- Ghildiyal, M., and P. D. Zamore: **Small silencing RNAs: an expanding universe.** *Nat Rev Genet* 2009, 10(2):94-108.
- Graur, D., Y. Zheng, N. Price, R. B. Azevedo, R. A. Zufall, and E. Elhaik: **On the immortality of television sets: "function" in the human genome according to the evolution-free gospel of ENCODE.** *Genome Biol Evol* 2013, 5(3):578-590.
- Honda, S., and Y. Kirino: **Dumbbell-PCR: a method to quantify specific small RNA variants with a single nucleotide resolution at terminal sequences.** *Nucleic Acids Res* 2015, 43(12):e77.
- Hudecek, M., Z. Izsvak, S. Johnen, M. Renner, G. Thumann, and Z. Ivics: **Going non-viral: the Sleeping Beauty transposon system breaks on through to the clinical side.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2017, 52(4):355-380.
- Ivics, Z., P. B. Hackett, R. H. Plasterk, and Z. Izsvak: **Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells.** *Cell* 1997, 91(4):501-510.
- Ivics, Z., and Z. Izsvak: **Transposons for gene therapy!** *Curr Gene Ther* 2006, 6(5):593-607.
- Jangam, D., C. Feschotte, and E. Betran: **Transposable Element Domestication As an Adaptation to Evolutionary Conflicts.** *Trends Genet* 2017, 33(11):817-831.

- Jemnitz, K., A. Batai-Konczos, M. Szabo, E. Ioja, O. Kolacsek, T. I. Orban, G. Torok, L. Homolya, E. Kovacs, I. Jablonkai, and Z. Veres: **A transgenic rat hepatocyte - Kupffer cell co-culture model for evaluation of direct and macrophage-related effect of poly(amidoamine) dendrimers.** *Toxicol In Vitro* 2017, 38:159-169.
- Johnson, J. M., S. Edwards, D. Shoemaker, and E. E. Schadt: **Dark matter in the genome: evidence of widespread transcription detected by microarray tiling experiments.** *Trends Genet* 2005, 21(2):93-102.
- Khvorova, A., A. Reynolds, and S. D. Jayasena: **Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias.** *Cell* 2003, 115(2):209-216.
- Kim, Y. K., and V. N. Kim: **Processing of intronic microRNAs.** *Embo J* 2007, 26(3):775-783.
- Kim, Y. K., J. Yu, T. S. Han, S. Y. Park, B. Namkoong, D. H. Kim, K. Hur, M. W. Yoo, H. J. Lee, H. K. Yang, and V. N. Kim: **Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer.** *Nucleic Acids Res* 2009, 37(5):1672-1681.
- Kolacsek, O., Z. Erdei, A. Apati, S. Sandor, Z. Izsvak, Z. Ivics, B. Sarkadi, and T. I. Orban: **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* 2014a, 25(4):241-252.
- Kolacsek, O., Z. Izsvák, Z. Ivics, B. Sarkadi, and T. I. Orbán: **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.* 2014b, pages: 97-123.
- Kolacsek, O., V. Krizsik, A. Schamberger, Z. Erdei, A. Apati, G. Varady, L. Mates, Z. Izsvak, Z. Ivics, B. Sarkadi, and T. I. Orban: **Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers.** *Mob DNA* 2011, 2(1):5.
- Kolacsek, O., and T. I. Orban: **Transcription activity of transposon sequence limits Sleeping Beauty transposition.** *Gene* 2018, 676:184-188.
- Kolacsek, O., E. Pergel, N. Varga, A. Apati, and T. I. Orban: **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* 2017, 598:43-49.
- Kolacsek, O., G. Wachtl, A. Fothi, A. Schamberger, S. Sandor, E. Pergel, N. Varga, T. Rasko, Z. Izsvak, A. Apati, and T. I. Orban: **Functional indications for transposase domestications - Characterization of the human piggyBac transposase derived (PGBD) activities.** *Gene* 2022, 834:146609.
- Krishnan, M., J. M. Park, F. Cao, D. Wang, R. Paulmurugan, J. R. Tseng, M. L. Gonzalgo, S. S. Gambhir, and J. C. Wu: **Effects of epigenetic modulation on reporter gene expression: implications for stem cell imaging.** *FASEB J* 2006, 20(1):106-108.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, *et al.*: **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 2001, 409(6822):860-921.
- Liew, C. G., J. S. Draper, J. Walsh, H. Moore, and P. W. Andrews: **Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells.** *Stem Cells* 2007, 25(6):1521-1528.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, 25(4):402-408.
- Lohe, A. R., and D. L. Hartl: **Autoregulation of mariner transposase activity by overproduction and dominant-negative complementation.** *Mol Biol Evol* 1996, 13(4):549-555.
- Mates, L., M. K. Chuah, E. Belay, B. Jerchow, N. Manoj, A. Acosta-Sanchez, D. P. Grzela, A. Schmitt, K. Becker, J. Matrai, L. Ma, E. Samara-Kuko, C. Gysemans, D. Pryputniewicz, C. Miskey, B. Fletcher, T. Vandendriessche, Z. Ivics, and Z. Izsvak: **Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates.** *Nat Genet* 2009, 41(6):753-761.
- Michlewski, G., and J. F. Caceres: **Post-transcriptional control of miRNA biogenesis.** *RNA* 2019, 25(1):1-16.
- Nakai, J., M. Ohkura, and K. Imoto: **A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein.** *Nat Biotechnol* 2001, 19(2):137-141.
- Neilsen, C. T., G. J. Goodall, and C. P. Bracken: **IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome.** *Trends Genet* 2012, 28(11):544-549.
- Newman, J. C., A. D. Bailey, H. Y. Fan, T. Pavelitz, and A. M. Weiner: **An abundant evolutionarily conserved CSB-PiggyBac fusion protein expressed in Cockayne syndrome.** *PLoS Genet* 2008, 4(3):e1000031.
- Nurk, S., S. Koren, A. Rhie, M. Rautiainen, A. V. Bzikadze, A. Mikheenko, M. R. Vollger, N. Altemose, L. Uralsky, A. Gershman, S. Aganezov, S. J. Hoyt, M. Diekhans, G. A. Logsdon, M. Alonge, S. E. Antonarakis, M. Borchers, G. G. Bouffard, S. Y. Brooks, G. V. Caldas, *et al.*: **The complete sequence of a human genome.** *Science* 2022, 376(6588):44-53.
- Okamura, K., J. W. Hagen, H. Duan, D. M. Tyler, and E. C. Lai: **The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila.** *Cell* 2007, 130(1):89-100.

- Olah, A., M. Ruppert, T. I. Orban, A. Apati, B. Sarkadi, B. Merkely, and T. Radovits: **Hemodynamic characterization of a transgenic rat strain stably expressing the calcium sensor protein GCaMP2.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019, 316(5):H1224-H1228.
- Orbán, T., A. Apáti, and B. Sarkadi: **Új remény a gén- és őssejtterápiában: a transzpozon alapú génbeviteli eljárások.** *Biokémia* 2009, 33(1):49-58.
- Orban, T. I.: **One locus, several functional RNAs-emerging roles of the mechanisms responsible for the sequence variability of microRNAs.** *Biol Futur* 2023, 74(1-2):17-28.
- Orbán, T. I., A. Apáti, Z. Izsvák, Z. Ivics, and B. Sarkadi: **Use of Transposon-Transposase Systems for Stable Genetic Modification of Embryonic Stem Cells.** in: *Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications; InTech Ed.* 2011, pages: 259-274.
- Orban, T. I., A. Apati, A. Nemeth, N. Varga, V. Krizsik, A. Schamberger, K. Szebenyi, Z. Erdei, G. Varady, E. Karaszi, L. Homolya, K. Nemet, E. Gocza, C. Miskey, L. Mates, Z. Izsvak, and B. Sarkadi: **Applying a "double-feature" promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery.** *Stem Cells* 2009, 27(5):1077-1087.
- Orban, T. I., and E. Izaurralde: **Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome.** *RNA* 2005, 11(4):459-469.
- Pennisi, E.: **Why do humans have so few genes?** *Science* 2005, 309(5731):80.
- Pillai, R. S.: **MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?** *RNA* 2005, 11(12):1753-1761.
- Ramalingam, P., J. K. Palanichamy, A. Singh, P. Das, M. Bhagat, M. A. Kassab, S. Sinha, and P. Chattopadhyay: **Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing.** *RNA* 2014, 20(1):76-87.
- Rasko, T., A. Pande, K. Radscheit, A. Zink, M. Singh, C. Sommer, G. Wachtl, O. Kolacsek, G. Inak, A. Szvetnik, S. Petrakis, M. Bunse, V. Bansal, M. Selbach, T. I. Orban, A. Prigione, L. D. Hurst, and Z. Izsvak: **A Novel Gene Controls a New Structure: PiggyBac Transposable Element-Derived 1, Unique to Mammals, Controls Mammal-Specific Neuronal Paraspeckles.** *Mol Biol Evol* 2022, 39(10):msac175.
- Ree, D., A. Fothi, N. Varga, O. Kolacsek, T. I. Orban, and A. Apati: **Partial Disturbance of Microprocessor Function in Human Stem Cells Carrying a Heterozygous Mutation in the DGCR8 Gene.** *Genes (Basel)* 2022, 13(11):1925.
- Ren, J., P. Jin, E. Wang, F. M. Marincola, and D. F. Stroncek: **MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells.** *J Transl Med* 2009, 7:20.
- Ruby, J. G., C. H. Jan, and D. P. Bartel: **Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing.** *Nature* 2007, 448(7149):83-86.
- Schamberger, A., and T. I. Orban: **3' IsomiR species and DNA contamination influence reliable quantification of microRNAs by stem-loop quantitative PCR.** *PLoS One* 2014a, 9(8):e106315.
- Schamberger, A., and T. I. Orban: **Experimental validation of predicted mammalian microRNAs of mirtron origin.** *Methods Mol Biol* 2014b, 1182:245-263.
- Schamberger, A., B. Sarkadi, and T. I. Orban: **Human mirtrons can express functional microRNAs simultaneously from both arms in a flanking exon-independent manner.** *RNA Biol* 2012, 9(9):1177-1185.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P. D. Zamore: **Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.** *Cell* 2003, 115(2):199-208.
- Suzuki, H. I., R. A. Young, and P. A. Sharp: **Super-Enhancer-Mediated RNA Processing Revealed by Integrative MicroRNA Network Analysis.** *Cell* 2017, 168(6):1000-1014 e1015.
- Szabo, Z., L. Heja, G. Szalay, O. Kekesi, A. Furedi, K. Szebenyi, A. Dobolyi, T. I. Orban, O. Kolacsek, T. Tompa, Z. Miskolczy, L. Biczok, B. Rozsa, B. Sarkadi, and J. Kardos: **Extensive astrocyte synchronization advances neuronal coupling in slow wave activity in vivo.** *Sci Rep* 2017, 7(1):6018.
- Szebenyi, K., A. Furedi, O. Kolacsek, R. Csohany, A. Prokai, K. Kis-Petik, A. Szabo, Z. Bosze, B. Bender, J. Tovari, A. Enyedi, T. I. Orban, A. Apati, and B. Sarkadi: **Visualization of Calcium Dynamics in Kidney Proximal Tubules.** *J Am Soc Nephrol* 2015a, 26(11):2731-2740.
- Szebenyi, K., A. Furedi, O. Kolacsek, E. Pergel, Z. Bosze, B. Bender, P. Vajdovich, J. Tovari, L. Homolya, G. Szakacs, L. Heja, A. Enyedi, B. Sarkadi, A. Apati, and T. I. Orban: **Generation of a Homozygous Transgenic Rat Strain Stably Expressing a Calcium Sensor Protein for Direct Examination of Calcium Signaling.** *Sci Rep* 2015b, 5:12645.
- Tallini, Y. N., M. Ohkura, B. R. Choi, G. Ji, K. Imoto, R. Doran, J. Lee, P. Plan, J. Wilson, H. B. Xin, A. Sanbe, J. Gulick, J. Mathai, J. Robbins, G. Salama, J. Nakai, and M. I. Kotlikoff: **Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca²⁺ indicator GCaMP2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(12):4753-4758.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang,

- C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, *et al.*: **The sequence of the human genome.** *Science* 2001, 291(5507):1304-1351.
- Wachtl, G., E. Schad, K. Huszar, A. Palazzo, Z. Ivics, A. Tantos, and T. I. Orban: **Functional Characterization of the N-Terminal Disordered Region of the piggyBac Transposase.** *Int J Mol Sci* 2022, 23(18).
- Wang, J., T. Bing, N. Zhang, X. Liu, and D. Shangguan: **FnCas12a/crRNA assisted dumbbell-PCR detection of IsoMiRs with terminal and inner sequence variants.** *Chem Commun (Camb)* 2020, 56(69):10038-10041.
- Wells, J. N., and C. Feschotte: **A Field Guide to Eukaryotic Transposable Elements.** *Annu Rev Genet* 2020, 54:539-561.
- Wicker, T., F. Sabot, A. Hua-Van, J. L. Bennetzen, P. Capy, B. Chalhoub, A. Flavell, P. Leroy, M. Morgante, O. Panaud, E. Paux, P. SanMiguel, and A. H. Schulman: **A unified classification system for eukaryotic transposable elements.** *Nat Rev Genet* 2007, 8(12):973-982.
- Yusa, K., L. Zhou, M. A. Li, A. Bradley, and N. L. Craig: **A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108(4):1531-1536.
- Zamore, P. D., and B. Haley: **Ribo-gnome: the big world of small RNAs.** *Science* 2005, 309(5740):1519-1524.
- Zhou, H., M. L. Arcila, Z. Li, E. J. Lee, C. Henzler, J. Liu, T. M. Rana, and K. S. Kosik: **Deep annotation of mouse iso-miR and iso-moR variation.** *Nucleic Acids Res* 2012, 40(13):5864-5875.