

Paul-Ehrlich-Institut Postfach 63207 Langen

Prof. Dr. Zoltan Ivics
Head of Division
Division of Medical Biotechnology

Phone +49 6103 77 6000
Fax +49 6103 77 1280
E-Mail zoltan.ivics@pei.de

18. Dezember 2012

VÁLASZ

Dr. Vértessy G. Beáta opponensi véleményére

Hálásan köszönöm Vértessy G. Beáta Professzor Asszony részletes és alapos értekezését. Professzor Asszony megjegyzésére és kérdéseire alábbiakban válaszolok:

Eloszor a megjegyzésre ternek ki. A publikációval kapcsolatos talánynak prozai magyarázata van: PhD hallgatóm, aki ezen a projekten dolgozott, menet közben sikerrel megvédte PhD-ját és állást kapott máshol. Az a helyzet alakult ki (nem eloszor pályafutásom során), hogy bizonyos kísérletek elvégzését ill. megismétlést fontosnak tartottam a kézirat beküldéséhez, azonban az első szerző (a kísérletekért leginkább felelős főszereplő) már nem tartozkodott a laboromban. A kísérletek teljes befejezése tehát elhúzódott. Mindazonáltal orommal jelentem, hogy a kéziratot decemberben beküldtem a *Mobile DNA* „peer-reviewed” szaklapnak, így reményeim szerint a védeig a publikáció elfogadásra fog kerülni. A *Mobile DNA* egyébként egy transzpozonokkal, transzpozícióval, általában mobilis genetikai elemekkel foglalkozó, viszonylag új szaklap.

A kérdésekre adott válaszaim:

- 1) Jogos a kérdésfelvetés, hogy a gazdasejt bizonyos faktorai milyen módon lépnek kölcsönhatásba egy számukra idegen fehérjével. A magyarázat nagy valószínűséggel a fehérjek szekvenciabeli, de még inkább strukturális konzerváltságában rejlik. Például a HMGB1 fehérje interaktorai között szép számmal találhatóak homeodomain fehérjek, melyek között a homeodomain struktúra megleten kívül egyéb közös vonás nincs. Az SB transzpozáz N-terminális helix-turn-helix domainje szintén a homeodomain struktúrát veszi fel, ezt nevezük PAIRED box-nak, és nagy valószínűséggel a transzkripcios faktorok PAIRED domainje osi transzpozázokból alakult ki. Tehát a HMGB1 fehérje egyéb faktorokkal való kölcsönhatását valószínűleg inkább a struktúra, mintsem a primer aminosav sorrend határozza meg. Valószínűleg ugyanez érvényes magára a HMGB1 fehérjére is: a DNS kötésért is felelős HMG-box evolúciós értelemben



(hasonloan a homeodomainhez) nagy mertekben konzervált. Hasonló lehet a helyzet a Ku DNS repair faktorra is. Időközben kimutatták, hogy nemcsak az SB transzpozáz, de a transzpozázokból evolválódott Rag1 rekombináza is kölcsönhatásba lép ezekkel a repair fehérjékkel (Raval et al. Evidence for Ku70/Ku80 association with full-length RAG1. NAR. 2008.36:2060-72. doi: 10.1093/nar/gkn049). Mivel az SB transzpozáz és a Rag1 rekombináza között számottevő szekvencia hasonlóság nem mutatható ki, nagy valószínűséggel itt is strukturális konzerváltság határozza meg az interakciókat (sajnos sem az SB transzpozáz, sem a Rag1 rekombináza esetében nem áll rendelkezésünkre valódi, fehérjeszerkezetre vonatkozó adat). Vegezetül el kell mondani, hogy az SB transzpozáz eddig megismert interaktorai (HMGB1, Ku, Miz1, HMG2L1) mind nagyfokú, primer aminosav szekvencia szintjén is megjelenő konzerváltságot mutatnak gerincesekben halaktól az emberig. Tehát igaz ugyan, hogy az SB transzpozáz egy emberi sejtből idegennek számít, de halakból származó sejtekben már nem. A halaktól emberig terjedő konzerváltság pedig lehetővé teszi a fehérje-fehérje kölcsönhatást nem hal-eredetű sejtekben is.

- 2) A kérdés részben összefügg az előzővel, legalábbis annyiban, hogy azon gazdasejt által kódolt faktorok, melyek szüksegesek magához a transzpozíciós folyamathoz (pl. Ku), nagyfokú konzerváltságot mutatnak gerincesekben. Ennek megfelelően az SB transzpozon minden egyes eddig tesztelt gerinces fajban működött. Másrészt viszont igaz, hogy ezen faktorok expressziós szintje változatos lehet az egyes fajok függvényében: pl. a Ku szintje jelentős eltérést mutathat különböző fajokban (emberben pl. magasabb, mint egerben), és ez a fajok között megfigyelhető, transzpozíciós hatékonyságban meglevő variabilitás egyik magyarázata lehet.
- 3) Kvantitatív, enzim-kinetikai adatok sajnos nem állnak rendelkezésre. Mi magunk próbáltuk az SB transzpozont transzpozícióra birni *in vitro* reakciókban, mindmáig sajnos eredménytelenül. Ennek lehetnek technikai okai, pl. nem megfelelő fehérje-folding ill. oldhatóság, valamint biokémiai okai, pl. valamely a transzpozíció szempontjából lényeges faktor hiánya vagy nem megfelelő reprezentáltsága a reakcióban. A gerinces rendszerekben is működőképes transzpozonok közül egyedül a *piggyBac*-re vonatkozóan állnak rendelkezésre *in vitro* adatok (ezek is inkább a transzpozíció molekuláris mechanizmusára mintsem a transzpozáz enzim-kinetikai tulajdonságaira vonatkozóan informatívak). *In vitro* adatok hiányában általában transzfektált sejtekben mérjük a transzpozíció hatékonyságát oly módon, hogy mérjük egy adott sejtpopulációban a transzpozíció atesett sejtek arányát, ill. a transzpozon átlagos sejtenkénti kópiaszámát. A két adatból következtetünk arra nézve, hogy egy adott sejtpopulációban adott idő alatt összesen hány transzpozíciós esemény következett be. Eredményeink azt mutatják, hogy human HeLa és CD34+ ossejtekben a rangsor így alakul: SB100X>PB>Tol2. A *Frog Prince*, a *Harbinger* és a *Hsmar1* transzpozonok human HeLa sejtekben elmaradnak hatékonyságban az előző csoporttól.
- 4) A mai tudásunk alapján úgy látom, messze a *Sleeping Beauty* transzpozon áll a legközelebb genterápiás alkalmazásokhoz. Az első klinikai kipróbálás 2012 tavaszától folyik az USA-ban rákos betegeken. A második nagy valószínűséggel Svédországban lesz Alzheimer-korú betegeken, a harmadik pedig reményeink szerint AMD-s (age-related macular degeneration) betegeken a mi aktív

kozremukodesunkkel egy 2012 novembereben indult EU FP7 kutatási program keretében. Ennek nagyrészt történeti okai vannak, hiszen az SB transzpozon volt a legelső, melyről ki lehetett mutatni, hogy hatékony genbevitelre képes emberi sejtekben, és ezáltal megnyitotta a kaput a terápiás alkalmazások irányába. Ennel fogva több kutatás irányult eddig az SB-re, mint az összes többi itt tárgyalt transzpozonra együttveve.

- 5) Mindket transzpozon nagy hatásfoku transzpozícióra képes emberi sejtekben, és transzgen-hordozó kapacitásuk is nagyjából hasonló. Mindket transzpozon un. Class II (cut and paste) transzpozon, tehát a transzpozíció alapvető mechanizmusa ugyanaz mindket transzpozon esetében. Vagyis a transzpozáz kóti a transzpozon vegeit, kivágja a donor DNS-ből, és inszertálja a cél DNS-be. Ebben a tekintetben tehát nincs különbség. A molekuláris részletekben azonban több lényeges különbség is van:
- a) A PB transzpozon vegein 1-1 transzpozáz kóti hely van, az SB transzpozon vegein pedig 2-2 ilyen hely van.
 - b) Az SB transzpozon kivágódása un. „footprint“-et hagy maga után. Ez az 5 bp-s szekvencia oly módon keletkezik, hogy bizonyos restrikciós endonukleázokhoz hasonlóan az SB transzpozáz tulnyuló veget general a megtört DNS vegein, mely NHEJ repair-t követően egy jellegzetes szekvencia motívumot hagy maga után. A PB transzpozáz szinten tulnyuló veget general kivágódáskor, de a tulnyuló veg a flanking DNS-ben van, nem pedig a transzpozon saját szekvenciájában, így NHEJ repair-t követően az eredeti szekvencia teljesen helyreáll (nincs footprint).
 - c) Az SB transzpozon vektorhoz köthető transzkripciósi aktivitás marginális (a disszertációban tárgyalt III. publikáció), míg a PB transzpozon 5' vegehez jelentős transzkripciósi aktivitás köthető (Cadinanos and Bradley, NAR, 2007, doi:10.1093/nar/gkm446).
 - d) Az SB transzpozon egy emberi sejtben „idegen“ olyan szempontból, hogy a human genom nem tartalmaz SB-hez hasonló transzpozont vagy transzpozázt. Ezzel szemben a human genom tartalmaz PB-hez hasonló transzpozon szekvenciákat és emberi sejtek expresszálják „haziasított“ PB transzpozázokat.
 - e) A célszekvenciákban jelentős különbség van: az SB mindig TA-ba inszertalódik, a PB majdnem mindig TTAA-ba. Az SB inszerciók random módon terkepeződnek a human genomban, a PB inszerciók preferenciát mutatnak a genek 5' reguláló régióira.

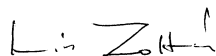
Mindaz a következő relatív előnyököt és hátrányokat eredményezi genterápiás alkalmazhatóság tekintetében:

- a) Az SB transzpozon vegein található ismétlődő transzpozáz-kóti helyek magasabb fokú precizitást eredményeznek a transzpozíció folyamatában. A 4 transzpozáz molekulából és 2 transzpozon vegből álló fehérje-DNS komplex egy szigorú szabályozást eredményez; a transzpozíció katalitikus lépései csak akkor indulhatnak be, ha ez a komplex megfelelően összeállt. A PB esetében ez a szabályozás relaxáltabb, hiszen itt összesen csak 2

transzpozaz koto hely van, es ennek eredményekében a reakció fidelitása alacsonyabb; gyakran figyelhetők meg lokális deleciók a transzpozon donor lokuszon.

- b) Elvben előfordulhat, hogy a primer transzpozíciós eseményt egy újabb kivagodás és újabb inszerció követi a genomban (szekunder transzpozíciós események). Ezen szekunder események gyakorisága jelenleg nem ismert. Amennyiben a primer inszerció egy kódoló szekvenciában (exonban) következett be (ennek gyakorisága az SB esetében az inszerció események kb. 1%-a), úgy az újabb kivagodás eltolja a leolvasási keretet, mert az SB egy 5 bp-os footprintet generál a kivagodási helyen. Tehát az esemény mutagenizáló hatása. A PB mutagenizáló hatása ebben a tekintetben alacsonyabb, mert a kivagodás mechanizmusa nem generál footprintet.
 - c) A genterapiás vektor-rendszerek kifejlesztésének kiemelt feladata, hogy az inszerció hely környezetében ne történjen transzkripció változása a sejt saját géneinek tekintetében. PI. proto-onkogének transzkripció aktiválása rák kialakulásához vezethet. Mivel az SB vektorok marginális transzkripció aktivitással bírnak, ilyen szempontból biztonságosabbak, mint a PB rendszer.
 - d) Elvben előfordulhat, hogy a PB transzpozáz mobilizál endogén human szekvenciákat, ill. hogy a „háziasított”, endogén PB transzpozázok mobilizálják a PB vektorral bejuttatott transzgeneket; az eredmény mindkét esetben a genom instabilitása. Ezzel szemben az SB transzpozíciója teljesen kiszámítható, mivel transzpozíció egyedül az SB transzpozáz jelenlétében játszódhat le, amely nem képes human szekvenciákat mobilizálni.
 - e) Az SB transzpozon random inszerciója nagyobb fokú biztonságot garantál, mint a PB gen-specifikus inszerciója. Ez a proto-onkogének lehetséges transzkripció aktiválása szempontjából nem mellékes szempont.
- 6) A dolgozat beadása óta a következő fontos eredmények születtek:
- a) Validáltuk az irányított transzpozíciót zinc finger fehérjékkel és az AAV vírus Rep DNS-kötő fehérjével fiziologiasan is releváns, endogén human célszekvenciákba.
[Retargeting sleeping beauty transposon insertions by engineered zinc finger DNA-binding domains.](#)
Voigt K, Gogol-Döring A, Miskey C, Chen W, Cathomen T, Izsvák Z, Ivics Z. Mol Ther. 2012 Oct;20(10):1852-62. doi: 10.1038/mt.2012.126. Epub 2012 Jul 10. PMID:22776959
[Retargeting transposon insertions by the adeno-associated virus Rep protein.](#)
Ammar I, Gogol-Döring A, Miskey C, Chen W, Cathomen T, Izsvák Z, Ivics Z. Nucleic Acids Res. 2012 Aug;40(14):6693-712. doi: 10.1093/nar/gks317. Epub 2012 Apr 19. PMID:22523082

- b) Kidolgoztunk egy nagy hatékonyságú módszert transzgenikus állatok eloállítására SB transzpozon vektorokkal.
- [Germline transgenic pigs by Sleeping Beauty transposition in porcine zygotes and targeted integration in the pig genome.](#)
Garrels W, Mátés L, Holler S, Dalda A, Taylor U, Petersen B, Niemann H, Izsvák Z, Ivics Z, Kues WA.
PLoS One. 2011;6(8):e23573. doi: 10.1371/journal.pone.0023573. Epub 2011 Aug 29.
PMID:21897845
- [Precision genetic engineering in large mammals.](#)
Garrels W, Ivics Z, Kues WA.
Trends Biotechnol. 2012 Jul;30(7):386-93. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.03.008. Epub 2012 Apr 20. Review.
PMID:22521716
- c) Megalapoztuk az SB rendszer indukált pluripotens ossejtek (iPS) eloállítására való alkalmazását eger, sertés és human sejtekben.
- [Derivation and Characterization of Sleeping Beauty Transposon-Mediated Porcine Induced Pluripotent Stem Cells.](#)
Kues WA, Herrmann D, Barg-Kues B, Haridoss S, Nowak-Imialek M, Buchholz T, Streeck M, Grebe A, Grabundzija I, Merkert S, Martin U, Hall VJ, Rasmussen MA, Ivics Z, Hyttel P, Niemann H.
Stem Cells Dev. 2012 Nov 2. [Epub ahead of print]
PMID:22989381
- [Sleeping Beauty Transposon-based System for Cellular Reprogramming and Targeted Gene Insertion in Induced Pluripotent Stem Cells](#)
Grabundzija I, Wang J, Sebe A, Erdei Z, Kajdi R, Devaraj A, Steinemann D, Szuhai K, Stein U, Cantz T, Schambach A, Baum C, Izsvák Z, Sarkadi B, Ivics Z.
Nucleic Acids Res. (in press)
- d) Beindítottunk egy EU FP7 által finanszírozott kutatási programot, melynek célja az SB rendszer AMD-s betegek genterápiájára való kidolgozása és alkalmazása (<http://www.vision-research.eu/index.php?id=785>).



Zoltan Ivics
Head of Division
Division of Medical Biotechnology
Paul Ehrlich Institute
Paul Ehrlich Str. 51-59
63225 Langen
Germany