

TDK dolgozat

37. OTDK Biológia Szekció

Szalmási Katinka

Szeged

2024

Szomatikus LINE-1 aktivitás vizsgálata másodgenerációs LINE-1 retrotranszpozon riporterekkel

Készítette:

Szalmási Katinka

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Intézet, Molekuláris Biológia Mesterszak II. évfolyam

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, Tumor Genom Kutatócsoport

Témavezető:

Dr. Mátés Lajos Ph.D.

Tudományos főmunkatárs, csoportvezető

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetika Intézet

Tumor Genom Kutatócsoport

Belső konzulens:

Dr. Huliák Ildikó Ph.D.

Egyetemi adjunktus

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék



Tartalom

1.	Rövidítések jegyzéke	4
2.	Összefoglalás	5
3.	Bevezetés	6
3.1.	Általános bevezetés	6
3.2.	Irodalmi áttekintés	8
3.2.1.	A transzpozábilis elemek	8
3.2.2.	A LINE-1 retrotranszpozonok	10
3.2.3.	A LINE-1 retrotranszpozíció	11
3.2.4.	A LINE-1 aktivitást szabályozó celluláris mechanizmusok	12
3.2.5.	LINE-1 aktivitást befolyásoló tényezők és a retrotranszpozíció szerepe a rák kialakulásában	16
3.2.6.	Az ORFeus riporter működése	18
3.2.7.	A LINE-1 aktivitás <i>in vivo</i> vizsgálata és annak nehézségei szomatikus sejtekben	20
4.	Célkitűzés	23
5.	Anyag és módszer	23
5.1.	A másodgenerációs ORFeus riporter konstrukció létrehozása <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> kísérletekhez	23
5.1.1.	<i>In vitro</i> transzfekció	24
5.1.2.	Áramlási citometria	25
5.2.	Az intron-shifted konstrukció tesztelése <i>in vivo</i> modellben	25
5.2.1.	Állatok gondozása	25
5.2.2.	<i>In vivo</i> génbevitel	25
5.2.3.	Sztereomikroszkópos makrovizualizáció	26
5.2.4.	Immunhisztokémia	26
6.	Eredmények	27
6.1.	Az intron-shifted ORFeus konstrukció	27
6.2.	Az intron-shifted ORFeus konstrukció tesztelése <i>in vitro</i>	28
6.3.	Az intron-shifted ORFeus riporter tesztelése <i>in vivo</i>	29
7.	Megbeszélés	31
8.	Következtetések	34

9. Köszönetnyilvánítás	34
10. Hivatkozások	35

1. Rövidítések jegyzéke

ADAR – RNS adenzin-dezamináz	PAB – Poli(A) kötő fehérje
ADAR1/ADAR2 – RNS adenzin-dezamináz 1/2	citoplazmatikus 1
AID – Aktiváció-indukált dezamináz	PARP2 – Poli(ADP-ribóz)-polimeráz 2
AID – Aktiváció-indukált dezamináz	piRNS – PIWI fehérjét kötő RNS
AP-1 – Aktiváló fehérje 1	RAG1/RAG2 – Rekombináció aktiváló
APOBEC3 - Apolipoprotein B mRNS-szerkesztő	gén 1/2
enzim katalitikus polipeptid alegység 3	RISC – RNS-indukált csendesítő
ATM - Ataxia-telangiectasia mutált fehérje	komplex
BRCA1/BRCA2 – Mellrák 1/2	RPA – Replikációs fehérje A
eIFG4 – Eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4	SAMHD1 – SAM és HD domént kötő
ESCRT – Endoszómális válogató komplex	fehérje
FANCD2 - Fanconi anémia D2 fehérje	SIRT6/SIRT7 – Szirtuin gén 6/7
hA3A - Humán APOBEC3A fehérje	TUT4/TUT7 – Terminális uridil
hA3B - Humán APOBEC3B fehérje	transzferáz 4/7
hA3C - Humán APOBEC3C fehérje	
hA3DE - Humán APOBEC3DE kombinált fehérje	
hA3F - Humán APOBEC3F fehérje	
HERV-K – Humán endogén retrovírus-K	
hnRNPA1 – Heterogén nukleáris ribonukleoprotein A1	
KPNA – Karioferin alfa	
MDA5 - Melanoma differenciáció-asszociált fehérje 5	
MEPC2 - Methyl-CpG-kötő fehérje 2	
MOV10 - Moloney leukémia vírus 10	
NF-kB - Nukleáris faktor kappa B	
NHEJ – Nem-homológ vég összeillesztés	
NuRD komplex - Nukleosómális és remodeling	
deacetiláz komplex	
ORF1/ORF2 – Nyitott leolvasási keret 1/2	

2. Összefoglalás

A rákkutatás egy fontos, innovatív területét képezi a szomatikus LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Element-1) retrotranszpozíciós aktivitás vizsgálata, e mobilis genetikai elemek karcinogenezisben betöltött szerepének feltérképezése. Az emberi genom csaknem 17%-át LINE-1 elemek alkotják, melyek az egyetlen mindmáig aktív, autonóm transzpozonok az örökítőanyagunkban. A mobilis LINE-1 elemek önálló replikációra képesek retrotranszpozíció segítségével, mely során szekvenciájuk először RNS intermedierré íródik át, majd erről cDNS másolat képződik, amely véletlenszerűen integrálódik be egy új genomi pozícióba. A szomatikus sejtek rendelkeznek megfelelő védekező mechanizmusokkal, melyek megakadályozzák a LINE-1 retrotranszpozonok replikációját, azonban patológias körülmények között a retrotranszpozonok aktívvá válnak, ami az új LINE-1 inszerciók megjelenésén túlmenően különböző genomi átrendeződéseket is okozhat. Mindezek az indukált genetikai változások tumorok kialakulásához vezethetnek.

A LINE-1 retrotranszpozonok abundanciája és repetítív természete miatt számos technikai kihívás merül fel a *de novo* retrotranszpozíciós események detektálása során. Az ORFeus típusú riporterek lehetővé teszik a LINE-1 retrotranszpozíció nyomon követését az őket kifejező sejtekben. Az ORFeus riportertben egy szintetikus LINE-1 elembe olyan módon építették be a zöld fluoreszcens fehérje (EGFP) kódoló szekvenciáját, hogy arról csak akkor képződik működőképes EGFP fehérje, ha lejátszódik a retrotranszpozíció. Azonban egy, az ORFeus riportert szomatikus sejteiben kifejező egér modellben a EGFP pozitivitás immunhisztokémiával (IHC) jelenleg nem vizsgálható. Egy a GFP kódoló szekvencia 75%-át reprezentáló nem fluoreszcens csonkolt EGFP polipeptid minden ORFeus riportert kifejező sejtben jelen van anélkül, hogy lejátszódná a retrotranszpozíció. Ezen fragmentumhoz képesek kötődni a kereskedelmi forgalomban kapható EGFP antitestek, fals pozitivitást eredményezve IHC során.

Kutatásunk célja volt létrehozni egy olyan másodgenerációs ORFeus riportert konstrukciót, melyről, ha retrotranszpozíció hiányában képződnek is fehérje fragmentumok, ezek nem tartalmazzák a legtöbb EGFP specifikus antitest kötődéséhez szükséges epitópot. Konstrukciónk működőképességét *in vitro* és *in vivo* modellben is sikerült igazolni.

Humán (HepG2) hepatocelluláris karcinóma sejteket transzfektálva, áramlási citometria segítségével méréseket végezve, nem találtunk szignifikáns különbséget az EGFP

pozitív sejtek arányában az eredeti riporter konstrukcióval transzfektált kontrollhoz képest. Így az EGFP szekvenciában végzett módosítások nem befolyásolták számottevően az ORFeus riporter retrotranszpozíciós aktivitását. *In vivo*, szomatikus, májat célzó génbevitel segítségével állatmodellben is nyomon követtük az ORFeus riporter működését. A konstrukció hidrodinamikai injektálását követően IHC segítségével monitoroztuk az egerek májában a riporter expressziót, amely szintén az elvárásoknak megfelelő szinten kifejeződött, valamint képesek voltunk a retrotranszpozíciót átesett sejtek specifikus detektálására.

A jövőben másodgenerációs ORFeus riporterünk felhasználható egy olyan toxikológiai eljárás kialakítására, amellyel a szomatikus LINE-1 aktivitás befolyásolására képes gyógyszerek, vegyszerek vagy környezeti hatások kiszűrhetőek lesznek. A LINE-1 retrotranszpozíció igazolt genotoxikus hatása miatt különösen fontos feltérképezni ezen anyagokat.

3. Bevezetés

3.1. Általános bevezetés

Világszerte a rákos megbetegedések jelentik az egyik legsúlyosabb egészségügyi problémát, melyek a második legtöbb elhalálozással járó kóros elváltozások a szív-, és érrendszeri megbetegedések után [1]. A tumorképződésre számos külső és belső faktor hatással lehet. Egyre növekvő veszélyt jelentenek a környezetbe kikerülő genotoxikus anyagok, melyek DNS károsító hatásuk miatt mutációk felhalmozódását indukálják szomatikus sejtekben. A genetikai stabilitás felborulása kóros elváltozásokhoz és rosszindulatú sejtburjánzáshoz vezet. Ezen anyagok toxikus hatása közvetve is érvényesülhet olyan endogén genetikai elemek aktiválásán keresztül, mint a LINE-1 retrotranszpozonok [2].

A LINE-1 retrotranszpozonok fehérje kódoló szekvenciák melyek a humán genom közel 17%-át alkotják. Ezen elemek az egyetlen ismert, mindmáig autonóm transzpozonok, melyek önálló replikációra képesek. A retrotranszpozíciós mechanizmus lehetővé teszi a LINE-1 retroelemek mozgását az örökítőanyagunkban. A folyamat során a genomi szekvenciájukról először RNS intermediert íródik át, melyről a citoplazmában transzlálódik és ribonukleoprotein (RNP) alakul ki. A sejtmagba visszajutva az RNS intermedierről egy cDNS (komplementer DNS) másolat készül, mely egy új genomi pozícióba integrálódik [3].

A LINE-1 elemek expressziója és mozgása egészséges csíra- és szomatikus sejtekben szigorú celluláris szabályozás alatt áll. A retrotranspozíció transzkripció, poszt-transzkripció és integrációs fázisai egyaránt a sejt által kontrolláltak [4]. A csírasejtekben és az embrionális fejlődés korai szakaszában megfigyelhető bizonyos mértékű LINE-1 aktivitás. A csírasejtekben fenntartott LINE-1 aktivitás (1 LINE-1 ugrás / 50-100 ivarsejt) alkalmas az evolúció sebességének növelésére (pl. exon shuffling által) [5]. Az ennél jóval nagyobb mértékű LINE-1 aktivitás az embrionális fejlődés korai szakaszában fontos szerepet tölthet be a génexpresszió és az embrió fejlődésének szabályozásában. Az egyedfejlődés későbbi szakaszaiban azonban különböző mechanizmusok révén teljes kontroll alá kerül működésük, így egészséges szomatikus sejtekben nem mutatható ki LINE-1 expresszió [6].

Patológias körülmények között e védelmi rendszerek meghibásodhatnak, melyek a LINE-1 elemek fokozott aktivitását eredményezhetik. A retrotranspozíciós események hozzájárulnak a genetikai instabilitás növekedéséhez. Maguk az inszerciók géntúlműködést és gén funkció kiesést egyaránt okozhatnak, mindemellett a LINE-1 aktivitás epigenetikai változásokat, kromoszóma deléciókat és átrendeződéseket is kiválthat [7]. Ezen mutációk, ha a csírasejtekben játszódnak le, olyan különböző öröklődő genetikai betegségek kialakulásához vezethetnek, mint az A-típusú hemofília, Retinitis pigmentosa vagy Duchenne-féle izomdisztrófia [8]. A LINE-1 fehérjék megnövekedett expressziója fokozott immunválaszt válthat ki a szervezet részéről, mely krónikus gyulladás és autoimmun betegségek kifejlődését indukálhatja. Kimutatták ezen retrotranspozonok szerepét például szisztémás lupusz eritematózus (SLE), reumatoid arthritisz (RA) vagy szklerózis multiplex (SM) kialakulásában, melyek a leggyakoribb krónikus autoimmun betegségek [9], [10].

A LINE-1 retrotranspozonok aktivitása lehet tumorok képződésének közvetlen oka, különböző driver mutációk indukciója által. A LINE-1 inszerciók tumor szupresszor gének kikapcsolása és onkogének indukálása, és számos egyéb komplex mechanizmus révén szerepet játszanak a karcinogenezis folyamatában. Számos rákos elváltozás kialakulása során kimutatták a szomatikus sejtek fokozott LINE-1 expresszióját, így például a vastag- és vékonybélrák, nyelőcső- vagy májtumorok esetében [11], [12]. Egyre több kutatás irányul az olyan környezeti tényezők, gyógyszerek, vegyszerek vagy egyéb kemikáliák vizsgálatára, amelyek pozitívan befolyásolják a LINE-1 elemek aktivitását. Mivel ezen anyagok közvetlenül részt vesznek a genomi stabilitás felborulásában, így a karcinogének egy új, még kevésbé ismert csoportját alkotják. Tehát a rákkutatás fontos és nem elhanyagolható része

ezen faktorok felderítése, melyhez először is szükséges, hogy a szomatikus LINE-1 aktivitást vizsgálni tudjunk.

3.2. Irodalmi áttekintés

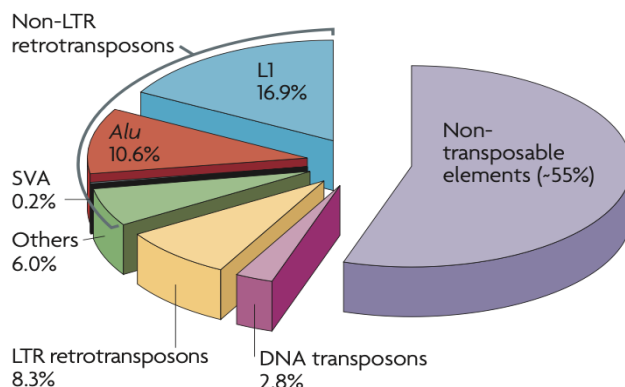
3.2.1. A transzpozázibilis elemek

A humán genom csaknem felét ismétlődő szekvenciák alkotják, melyek jelentős része mobilis genetikai elemekből vagy másnéven transzpozonokból származik [1]. Ezeket a szekvenciákat korábban funkcionálküli, úgynevezett „junk” DNS-nek tartották. Azonban ma már fontos szerepet tulajdonítanak nekik például a genomi stabilitás és diverzitás fenntartásában és ezáltal az evolúcióban [13]. A transzpozonokat először Barbara McClintock fedezte fel a kukorica kromoszómáinak vizsgálata során [14]. Azóta kimutatták jelenlétüket a legtöbb prokarióta és eukarióta organizmus genomjában. Egyes élőlények esetében a genom jelentős részét alkotják, mint például a kukorica genetikai állományának körülbelül 85%-át [15]. Ezen genetikai elemek transzpozíció során képesek változtatni a genomi pozíciójukat. Bár a legtöbb transzpozázibilis elem az evolúció során felhalmozott mutációk és a gazdaszervezettel vívott fegyverkezési verseny miatt elvesztette mobilizációs képességét [16]. A transzpozonoknak két nagy csoportját különböztetjük meg a transzpozíció mechanizmusa alapján: a DNS- és a retrotranszpozonokat.

A DNS transzpozon szekvenciákat ITR (invertált terminális ismétlődő szekvencia) régiók határolják, melyek a transzpozáz enzim felismerési helyül szolgálnak. A transzpozíció során először ezekhez a régiókhoz kapcsolódik az enzim, majd egy „cut and paste” mechanizmussal kivágja és egy új genomi helyre illeszti a transzpozon szekvenciát [17]. Ezen transzpozonok a humán genom körülbelül 3%-át teszik ki, de mára a legtöbb emlős állatban és az emberekben is inaktíválódtak. Találhatunk azonban példát ún. „háziasított” transzpozonokra, melyek különböző funkciókra tettek szert a fejlődés során. A gerincesek adaptív immunrendszerében találhatunk például strukturális és működésbeli hasonlóságokat a DNS transzpozonok működési mechanizmusával. A limfociták érése során az immunitásban részt vevő gének összeállítása rekombinációval történik, melyben a transzpozon eredetű RAG1/RAG2 endonukleázoknak van szerepe [18]. A széles körű, antigének elleni védelmet a szomatikus rekombináció teszi lehetővé, amely vírusokból és transzpozonokból fejlődött ki [19]. Valamint sok genetikai komponens, mint a telomer és centromer régiók, telomerázok, intronok, nem kódoló RNS-ek jelentős része transzpozon eredetre vezethetők vissza [20].

A retrotranszpozonok „copy and paste” mechanizmussal mozognak a genomon belül. Ennek során szekvenciájuk először RNS intermedierré íródik át, melyről reverz transzkripcióval DNS másolat képződik és ez egy új genomi lokuszba inszertálódik. A retrotranszpozonokat LTR és non-LTR elemekre lehet osztani az LTR (hosszú terminális ismétlődő szekvencia) jelenléte vagy hiánya alapján. Az LTR retroelemek a humán genom 8%-ban vannak jelen, azonban retrotranspozícióra nem képesek a felhalmozott mutációk és a szekvenciájuk csonkoltsága miatt. Ezen elemek nagyfokú hasonlóságot mutatnak funkciójukat és struktúrájukat tekintve a retrovírusokkal. Az LTR elemek szintén rendelkeznek például a *pol* és *gag* ORF-ekkel (nyitott leolvasási keret), de nem tartalmazzák az *envelope* (ENV) gént, mely lehetővé teszi, hogy a retrovírusok a gazda sejtekhez kapcsolódjanak és a sejtekbe jussanak [21]. Az LTR retrotranszpozonok közé tartoznak például az endogén retrovírusok (ERVek), melyek legismertebb képviselői a HERV-K vírusok. Esetükben megfigyelhető intakt ORF-ek és transzkripció aktivitás az embriogenezis során [22].

A legtöbb humán retrotranszpozon azonban a non-LTR elemek közé tartozik (**1. ábra**). Ebbe a csoportba a LINE-1, SINE és a SINE-VNTR-Alu (SVA) elemek tartoznak [23]. A LINE-1-ek a genom 17%-át, míg a SINE elemek a 13%-át alkotják [24]. A non-LTR elemek fehérje kódoló génekhez hasonló szekvenciával rendelkeznek, elejükön egy promóterrel és végükön egy poliA szignállal. A SINE és SVA elemek azonban nem autonóm retrotranszpozonok. Transzkripciójukért az RNS polimeráz III felel és nem kódolják a retrotranspozícióhoz szükséges reverz transzkriptáz enzimet. Így mobilizációjukhoz az autonóm LINE-1 által kódolt enzim apparátust (ORF2p) használják fel. Ennek ellenére a leggyakoribb képviselőjük, az Alu elemek fontos szerepet játszanak különböző poszt-transzkripció folyamatok során, mint az alternatív splicing, RNS módosítás és a transláció szabályozása [25], [26].



1. ábra: A transzpozonok eloszlási aránya az emberi genomban [24].

3.2.2. A LINE-1 retrotranszpozonok

Bár a humán genom több millió retrotranszpozon kópiát tartalmaz, a legtöbb retrotranszpozíciós esemény egyedül a LINE-1 elemekhez köthető. Körülbelül 70 millió évvel ezelőtt kerültek az emlősök genomjába és azóta együtt fejlődtek velük megőrizve mobilizációs képességüket. A retrotranszpozíciós események következtében képesek a saját szekvenciájukat megsokszorozni a sejt genomjában és átörököteni az utód sejtekbe. Újabb kutatások alapján egyre inkább terjed az a nézet, miszerint ezen elemek kölcsönösen előnyös kapcsolatban állnak a gazda szervezettel. A LINE-1 elemek fenntartják a genetikai diverzitást, így hozzájárulnak az adaptív evolúcióhoz [27]. A különböző környezeti változásokhoz való alkalmazkodást a pozitív szelekció hajtja és a rekombinációból adódó genomi változatosság az alapja. A transzpozon gazdag régiók a gyorsan változó részeivé válnak a genomnak és így hozzá járulhatnak környezethez való gyorsabb alkalmazkodáshoz. Azonban a természetes szelekció eliminálja azokat a káros transzpozon inszerciákat, melyek negatív hatással vannak a gazda fitneszére [28]. Egy populáción belül eltérő lehet a transzpozon szekvenciák expressziós szintje, mely a különböző leszármazási ágakban eltérő szabályozó és kódoló szekvenciák kialakulását eredményezheti. Ez a jelenség a fenotípusos diverzitás és fajképződés alapjául szolgálhat [29].

A LINE-1 elemek számos egyéb fontos funkcióval rendelkeznek. A korai embriogenezis során a csírasejtekben szerepet játszanak a génexpresszió szabályozásában és az X kromoszóma inaktiválásában. Ezen kívül részt vesznek a neurogenezisben is [30], [31], [32].

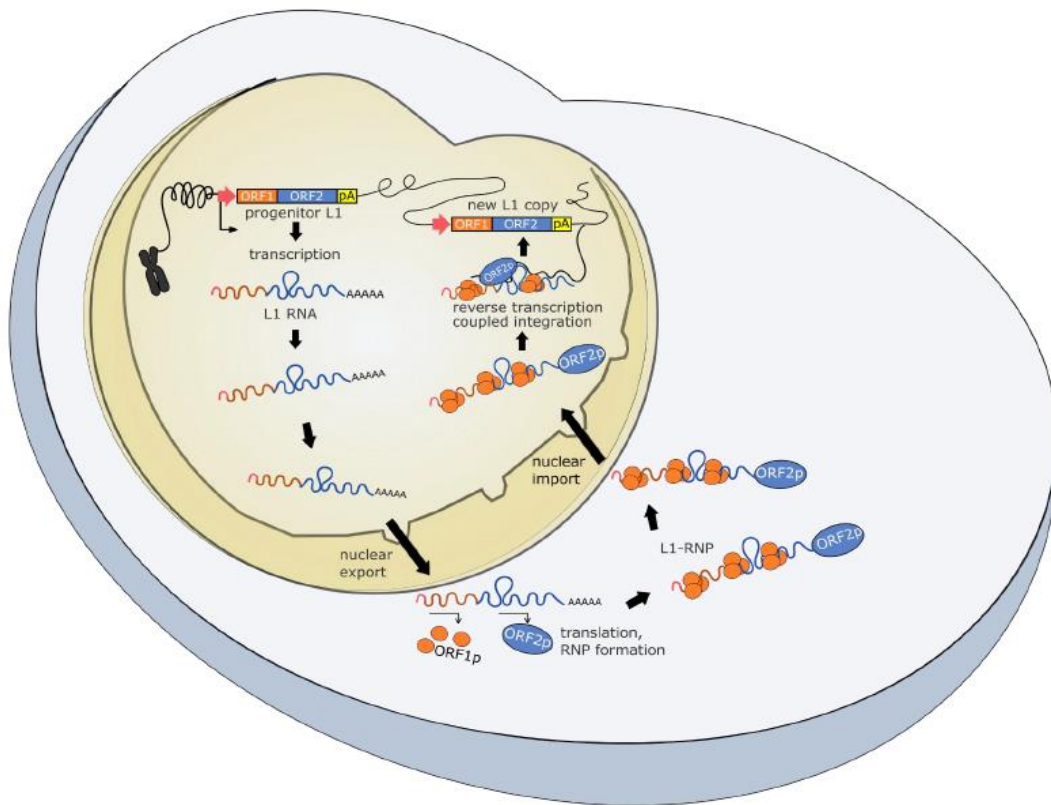
A LINE-1 retrotranszpozonok a humán genom 17%-át alkotják. Ez mintegy 500000 kópiát jelent a genomban, melyek közül a legtöbb csonkolt és mutálódott a fejlődés során. Mindössze körülbelül 150 LINE-1 kópia van jelen teljes, retrotranszpozícióra képes formában. A LINE-1 elem az egyetlen mindmáig autonóm transzpozon [33]. A teljes LINE-1 szekvencia 6000 bázispár hosszú és egy kétirányú promóterrel kezdődik, mely az 5' UTR (nem transzlálódó) régióban foglal helyet. Ezt követi két ORF, az ORF1 és ORF2, majd a 3' UTR régió, melyet egy poliadenilációs szignál (poliA) zár le (**2. ábra**). Az ORF1 egy 40 kDa tömegű chaperone aktivitással rendelkező fehérjét kódol, mely szükséges a LINE-1 mRNS stabilizálásához. Az ORF2 egy 150 kDa-os endonukleáz és reverz transzkriptáz funkcióval bíró fehérjét kódol, mely lehetővé teszi az új LINE-1 kópiák képződését és integrációját a genomba [34], [35].



2. ábra: A LINE-1 retrotranszpozon felépítése: A szekvencia az 5'UTR régióban található promóter régióval kezdődik (piros nyíl), ezt követi az ORF1 (narancssárga) és az ORF2 (világos kék) fehérjét kódoló szekvencia, majd a poliA farok (sárga).

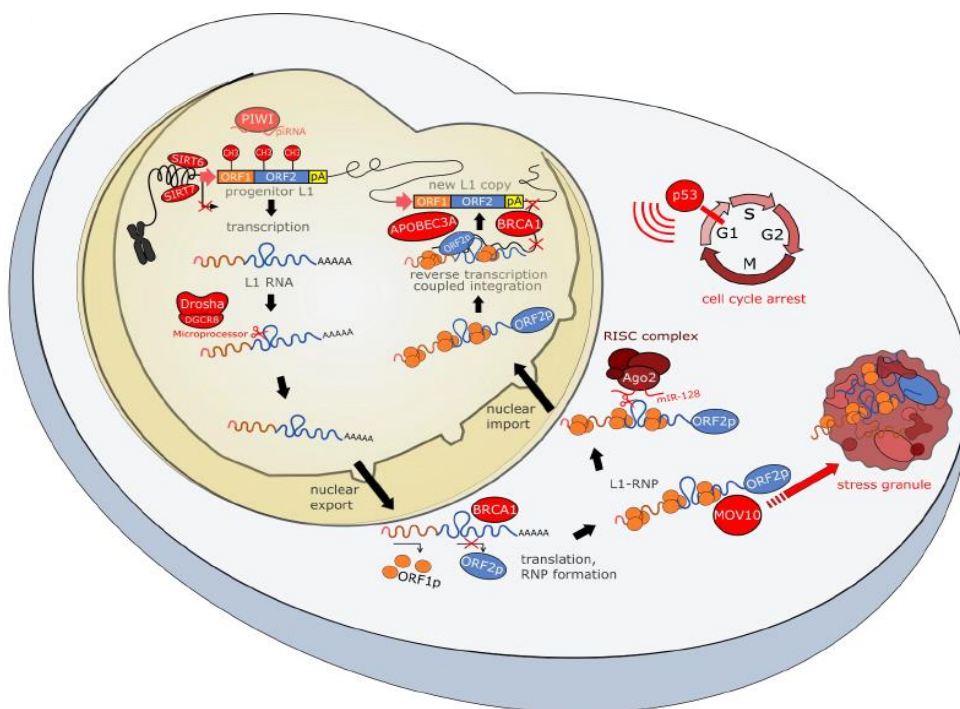
3.2.3. A LINE-1 retrotranszpozíció

A LINE-1 retrotranszpozonok úgynevezett *target primed reverz transzkripcióval* (TPRT) replikálják önmagukat (**3. ábra**) [36]. Ennek során először egy új mRNS molekula expresszálódik, melyet az 5' UTR promóter hajt. A RNS 3' végére az érés során egy poliA farok kerül, majd a molekula kilép a sejtmagból. Az ORF1 és ORF2 fehérjék transzlációja, valamint az L1 ribonukleoprotein (RNP) formálódása a citoplazmában játszódik le. Az RNP-ben az L1 mRNS és az ORF fehérjék összekapcsolódnak [37]. Ehhez szükséges, hogy a PABPC1 előbb a mRNS poliA farkához kapcsolódjon, ezután az LINE-1 RNP passzívan visszakerül a nukleuszba a sejtosztódás során, melyet a sejtmembrán struktúra ideiglenes meg bomlása tesz lehetővé [38]. Egyre több kutatási eredmény mutat arra, hogy a LINE-1 retrotranszpozíció nem csak osztódó sejtekben játszódhat le, hanem a LINE-1 RNP aktívan is visszajuthat a sejtmagba [39]. Ebben szerepet játszhat az ESCRT komplex [40]. Valamint ORF1 fehérjéhez kötődő KPNA fehérje család tagjai, melyek a sejtmagpórusokon keresztül történő fehérje transzportban játszanak szerepet [41]. A sejtmagba jutást követően ORF2 fehérje endonukleáz doménje elhasítja a genomi DNS-t a hasítási helynél, 3' OH-csoportot hagyva a szál végén. A célszekvencia egy poliT motívumot tartalmaz, mellyel a LINE-1 RNS poliA farka hibridizálni képes [42]. Az ORF2 reverz transzkriptáz doménje ezt templatként használva cDNS másolatot készít az RNS-ről. Ezt követi a cDNS másik szálának szintetizálása és az eltört DNS szál összeligálása, melyben endogén hibajavító enzimek vesznek részt. A PARP2 fehérje komplex felismeri a DNS szálon keletkezett hézagot és kölcsönhat az egyszálú DNS törések javításáért felelős RPA komplexszel. A fehérje komplexek interakciója és hibajavító mechanizmusa az új LINE-1 kópia DNS-be való integrálását eredményezi [43].



3. ábra: A LINE-1 retrotranszpozíciós ciklus: A LINE-1 szekvencia először mRNA intermedierré íródik át, amely kijut a citoplazmába és hozzákapcsolódik az ORF1 (narancssárga) és ORF2 (kék) fehérjékhez. A létrejött ribonukleoprotein visszajut a sejtmagba, ahol megtörténik a reverz transzkripció és a cDNS integrálása egy új genomi pozícióba.

3.2.4. A LINE-1 aktivitást szabályozó celluláris mechanizmusok



4. ábra: A LINE-1 retrotranszpozíciót szabályozó intracelluláris mechanizmusok szomatikus sejtekben: a LINE-1 retrotranszpozíció minden lépése szabályozott. A transzkripciót gátolja a DNS metiláció, hiszton fehérje módosítások és a heterokromatinizáció. Transzlációs szinten mind a LINE-1 mRNA, ORF1 és ORF2 fehérje, valamint a RNP degradációjáért felelős mechanizmusok működnek. A LINE-1 inszerciók pedig DNS hibajavító mechanizmusok által gátoltak.

A csírvonalban a Piwi-piRNS génexpressziót szabályozó útvonal a LINE-1 elemek aktivitását elsődlegesen szabályozó mechanizmus. Ez megenged egy alacsony LINE-1 aktivitást, ami a legújabb adatok szerint egy új retrotranszpozíciós eseményt jelent körülbelül 60 ivarsejtre nézve. A csírasejtekben a legfontosabb regulátor tényezők a piRNS-ek [44]. Ezek a sejtmagi PIWI fehérjét a LINE-1 szekvenciákhoz irányítják, melyek heterokromatint képeznek a szekvencián DNS metiláció vagy hiszton fehérje módosítások segítségével [45]. A heterokromatin régióban található szekvenciák transzkripció szempontból inaktívak. A PIWI fehérjék a citoplazmában is kifejtik hatásukat, a LINE-1 transzkriptumok szétdarabolásával.

A LINE-1 elemek szabályozásában különböző mechanizmusok vesznek részt melyek a retrotranszpozíció folyamatának minden lépése során működnek (4. ábra). Transzkripció szinten fontos szerepet játszik a DNS metiláció, a hiszton módosítások és a heterokromatinizáció, melyek az egyedfejlődés során a Piwi-piRNS útvonal csírvonalbeli aktivitásának köszönhetően adódnak tovább a testi sejtekbe, ahol hatékonyan akadályozzák a LINE-1 szekvenciák átíródását. Poszt-transzkripció szinten a LINE-1 RNS-t degradáló, az ORF1 és ORF2 fehérjék transzlációját és a LINE-1 RNP összeszerelődését és transzportját gátló faktorok érvényesülnek. Az integrációs fázisban pedig különböző DNS javító mechanizmusok akadályozzák meg az új LINE-1 kópiák inszercióját [6].

Az élőlények ontogenezise során megfigyelhető természetes változás a LINE-1 elemek aktivitásában [46]. Az embrió fejlődésének korai fázisaiban a LINE-1 elemek kifejeződnek, azonban a fejlődés előrehaladtával aktiválódnak a represszálo faktorok és egészséges szomatikus sejtekben a LINE-1 szekvenciák már inaktív állapotban vannak. Egyedül az idegszövet egyes ritka neuron sejtjeiben figyelhető meg bizonyos mértékű retrotranszpozon aktivitás [47].

A legtöbb testi (szomatikus) sejtben a genomi integritás megőrzése érdekében a LINE-1 aktivitás teljes kontroll alatt áll. Az embriót alkotó sejtek differenciálódása során bekapcsolnak a szomatikus sejtekben működő szabályozó folyamatok. Ekkor rögzülnek a DNS metilációs és heterokromatin mintázatok, amelyek egész életen át fennmaradnak. Ebben a sirtuin géncsalád tagjai is szerepet játszanak. Ezen géneket az élethossz és élettartam meghatározásával asszociálják, mert olyan különböző feladatokat látnak el a sejtekben, mint a DNS hibajavítás, telomer régiók hosszának szabályozása, gyulladás csökkentő folyamatok regulációja, rosszindulatú tumorok elleni védelem, sejt osztódás, riboszóma és fehérje szintézis. A *SIRT6* gén feladatai közé tartozik a LINE-1 elemek szupressziója, mely két módon játszódhat le: vagy a KAP1 fehérje mono-ADP ribozilációján keresztül történik, mely

eredményeként a LINE-1 szekvencia heterokromatinizálódik, vagy a LINE-1 promóter régióját metiláló *MEPC2* transzkripciós faktoron keresztül [48]. Újabb kutatások szerint a *SIRT7* gén is hasonló funkciókat lát el [49]. A sirtuin génnek mellett a NuRD multiprotein komplex is csökkenti a transzpozon szekvenciák hozzáférhetőségét, azáltal, hogy az 5' UTR régióban található promóterhez kötődik, csíra és szomatikus sejtekben egyaránt [50].

A transzkripciót követő fázisban több celluláris mechanizmus hat egyszerre a LINE-1 transzkriptumok ellen. Az egyik legfontosabb az RNS interferencia rendszer. Ebben a mikro-RNS-128 (miR-128) és a RISC komplexet alkotó Argonaute fehérje (Ago) tölt be fontos szerepet [51]. A folyamat többféleképpen is lejátszódhat. A miR-128 közvetlenül hozzá kapcsolódhat a LINE-1 mRNS ORF2 régiójához, amely hatására az effektor fehérjék degradálják a transzkriptumot. A mikro-RNS olyan celluláris faktorok működését is akadályozhatja, amelyek a LINE-1 RNP citoplazmából sejtmagba való visszajutását segítik. Ilyen faktor a fehérjék nukleuszba jutásában szerepet játszó transzportin-1 (TNPO1) és a hnRNPA1 [52]. Utóbbi a mRNS-ek poliA farkához kötődve stabilizálja azokat és a sejtmagba juttatja őket a sejtmagpórusokon keresztül [53].

A retroelemek és a vírusok közös evolúciós eredete miatt, a vírus fertőzések során aktiválódó sejtválaszok a retrotranszpozonok hatására is indukálódhatnak. Az interferon (IFN) szignalizációs utak különböző vírus elleni védekező mechanizmusokat indítanak be, melyeket a LINE-1 elemek is képesek stimulálni [54]. Vírusfertőzések során az RNáz L aktiválódik és elvágja a celluláris és virális RNS-eket. Az RNáz L a LINE-1 mRNS-eket is degradálja, így csökken az ORF1 és ORF2 fehérjék képződése [55]. A retrotranszpozon mRNS-ek a RIG-1 és MDA5 szenzorokat is stimulálják, fokozva ezzel az interferon termelést és az immunválaszt [56]. Az interferon-1 (IFN1) hatására aktiválódó TREX1 antivirális enzim részt vesz a LINE-1 ORF1 fehérjék proteoszómákba csomagolásában és lebontásában [57]. A SAM domén és a SAMHD1 fehérje az egyik legismertebb protektív komponensei a veleszületett immunitásnak. Megakadályozzák a vírusok replikációját és részt vesznek a retroelemek repressziójában is [58]. SAMHD1 főként a nukleuszban lokalizálódik, ahol az ORF2 szekvenciához kapcsolódik, megakadályozza a LINE-1 reverz transzkripcióját és csökkenti az ORF2 fehérjék expresszióját [59]. Újabb kutatások során kimutatták, hogy a SAMHD1 fehérje a citoplazmában is aktív és hozzájárul a LINE-1 RNS-ek stressz granulumokba csomagolásához és elimináláshoz [60]. Egy másik antivirális faktor a TRIM25a, amely LINE-1 receptorként működve immunválaszt vált ki az AP-1 és NF- κ B faktorok aktiválásán keresztül [61].

Az egyik legerősebb LINE-1 inhibítor a MOV10 helikáz [62]. Ez az enzim egyéb antivirális fehérjékkel komplexet képez és hozzá kapcsolódik a LINE-1 mRNS-hez. A kapcsolódás után a LINE-1 mRNS stressz granulumokba kerül és degradálódik. A MOV10 a ribonukleáz H2 (RNáz H2) enzimmel is kapcsolatba lép, ami megakadályozza a LINE-1 RNS-DNS heteroduplexek létrejöttét és így a retrotranszpozíciót [63].

Számos egyéb fehérjéről is kimutatták, hogy részt vesznek a LINE-1 inhibícióban. A TUT7 uridin transzferáz a sejtmagban uridin gyököt kapcsol a LINE-1 mRNS-re és megakadályozza a reverz transzkripciót, míg a TUT4 a citoplazmában destabilizálja az RNS-t [64]. A GAIT komplex (gamma-interferon-activated inhibitor of the translation complex) a mRNS transzlációját akadályozza meg, azáltal, hogy az RNS-hez kötődik és represszálja a transzláció iniciáló faktort (eIFG4) [65], [66].

Az *APOBEC3* fehérje család tagjai voltak az egyik elsőként felfedezett celluláris faktorok a LINE-1 elemek kontrolálatlan működése ellen, melyek kizárólag emberekben fordulnak elő [67]. A családba tartozó legtöbb fehérje (hA3A, hA3B, hA3C, hA3F és hA3DE) rendelkezik LINE-1 gátló aktivitással [68]. Az *APOBEC3* fehérjék poszt-transzkripció szinten hatnak a retrotranszpozonok ellen kétféle mechanizmus révén: dezamináz-függő vagy független úton. A legaktívabb enzim a hA3A deamináz aktivitással rendelkezik és uracilra cseréli le a citozint a LINE-1 cDNS első szálán, ami a molekula további degradációját iniciálja [69]. A hA3C és hA3DE dezamináz-független úton a reverz transzkripció leállítását blokkolja azáltal, hogy a LINE-1 RNP-hez és ORF1-hez kötődik a citoplazmában [70]. Evolúciósan jobban konzervált dezamináz aktivitással rendelkező fehérjék is működnek a LINE-1 elemek ellen. Ilyen például az *AID*, *APOBEC1*, *ADAR1* és *ADAR2* [71], [72]. Érdekesség, hogy a dezaminázok az *ADAR* enzimek kivételével, alacsony szinten működnek az agyban [73].

A sejt szabályozó mechanizmusai a LINE-1 retrotranszpozíció utolsó fázisában, az új LINE-1 kópiák genomba való integrálása során is működnek. Ebben főként az egyszálú és kétszálú DNS törések javításában részt vevő hibajavító enzimeknek van fontos szerepe. Az olyan DNS törések és a nem-homológ végek összekapcsolásában (NHEJ) szerepet játszó faktorok, mint például a DNA-PCK protein kináz és XRCC4 hibás működése a LINE-1 aktivitás növekedését eredményezi [74]. Az egyszálú DNS töréseket javító rendszer, a NER is hozzá járul a LINE-1 szupresszióhoz azáltal, hogy limitálja az inszerciákat és a nagy genomi duplikációkat az inszerciós helyen [75].

A poszt-replikációs DNS javító faktorok szintén hozzá járulnak a LINE-1 csendesítéshez. A DNS szál károsodása esetén az *ATM* gén aktiválja a CHK2, p53, BRCA1 faktorokat és az MRN komplexet (MRE11, Rad50, and NBS1), melyek részt vesznek a nukleinsav javításában. Az *ATM* enzim alulműködése a LINE-1 aktivitás megnövekedését eredményezi [76], [77]. Az SLX4 megakadályozza a LINE-1 terjedését azáltal, hogy komplexet képez a replikációs villában a retrotranszpozíció alatt. A FANCD2 faktor aktiválja a RAD18 ubikvitin ligázt, amely megakadályozza a LINE-1 integrálódást és az ORF1-hez kötődve proteoszómák és stressz granulumok formálódását indukálja [78]. A BRCA1 ubikvitin ligáz szintén fontos szerepet játszik a LINE-1-ek megfékezésében. Gátolja a LINE-1 cDNS replikációs villába való inszercióját azáltal, hogy serkenti a DNS szálak gyors bevonását védő burokkal a kettős-szálú törések helyén. A citoplazmában a BRCA1 megakadályozza az ORF2 fehérjék transzlációját és a LINE-1 RNP formálódását [79].

A LINE-1 retrotranszpozonok elleni védelem utolsó fokán a sejt ciklus faktorok állnak. Az egyik legismertebb tumorszupresszor a p53 transzkripciós faktor, amely a LINE-1 expresszió hatására szomatikus sejtekben képes a sejtciklus leállítását és apoptózist kiváltani, emellett a sejtmagban a LINE-1 5' UTR promóter régióhoz kapcsolódni és represszálni a retrotranszpozon transzkripciót. Csírasejtekben a p53 a piRNS szignalizációs út aktiválásán keresztül is képes hatni a LINE-1 elemekre [80], [81]. Egyéb sejt ciklust szabályozó transzkripciós faktorok, mint a p21 és a p27 az ORF2 fehérjéhez kapcsolódva akadályozzák az inszertálódást [82]. Ellentmondásos módon a *MYC* proto-onkogén is képes a LINE-1 represszállásra az 5' UTR régióhoz kötődve [83].

3.2.5. LINE-1 aktivitást befolyásoló tényezők és a retrotranszpozíció szerepe a rák kialakulásában

A LINE-1 retrotranszpozon aktivitás szabályozása tehát egy komplex és sok komponensű folyamat, melynek megfelelő koordinálása elengedhetetlen az emlősök és az ember egészséges fejlődése érdekében. A sejteket számos külső és belső hatás érheti életük során, melyek felboríthatják a belső egyensúlyt és megzavarhatják a LINE-1 elemek ellen működő védelmi rendszereket.

A szomatikus sejtek működését befolyásoló tényezők megzavarhatják a LINE-1 elemek represszált állapotát. Ezek a hatások lehetővé teszik a teljes retrotranszpozíciós ciklus lejtászódását, közvetlenül hatva a LINE-1 elemek expressziójára és integrálódására. Az

epigenetikai mintázatokat és a gének expressziós állapotát endogén és exogén tényezők egyaránt befolyásolják. Az egyed élete során megváltozhatnak ezeknek a regulátor faktoroknak a mennyisége és működése. A humán szervezetben a kor előre haladtával megnövekszik a gyulladást indukáló molekulák mennyisége. Egyes interleukinek, például az Interleukin-6 (IL-6) keringésben való fokozott jelenlétével párhuzamosan a LINE-1 szekvenciák hipometilációját figyelték meg [84]. A gyulladás hatására az oxidatív stressz is növekszik, mely a DNS metiltranszferázok, deacetilázok (SIRT1) transzlokációját eredményezi a LINE-1 szekvenciákról [85]. Az öregedés során a SIRT6 deacetiláz mennyisége csökken, amely szintén fokozza a LINE-1 elemek expresszióját [86].

A LINE-1 elemek aktivitását azonban különböző környezeti stresszfaktorok, az életviteli szokások és tápanyagbevitel is befolyásolhatják [87]. Számos bizonyítottan rákkeltő anyagról kimutatták, hogy epigenetikai vagy egyéb celluláris változást indukálva pozitívan befolyásolják a LINE-1 elemek aktivitását. A dohányzás, alkohol és narkotikus anyagok fogyasztása megváltoztatja többek között a metiltranszferáz enzimek működését, amely epimutációk felhalmozódását eredményezheti. Különböző nehézfémek, például az arzén, kobalt vagy alumínium, valamint az ionizáló sugárzás szintén pozitívan hat a LINE-1 retrotranszpozíciós aktivitásra [88]. Humán sejtkultúrán végzett kísérletek során a HgS, Cds, NiO háromszorosára növelték a LINE-1 retrotranszpozíciók számát [89].

A kontrollálatlan LINE-1 retrotranszpozíciós események nagy mértékben megnövelik a genomi instabilitást. Aktivitásuk sporadikus rákos sejtburjánzás kialakulásáért felelős driver mutációk létrejöttét eredményezheti. Az újonnan létrejött retrotranszpozon kópiák random helyekre integrálódnak a DNS szálra. Ha a génekben landolnak megváltoztatják a gén működését vagy teljes génfunkció kiesést okoznak [90]. Szabályozó enhanszer, represszor vagy promóter régiók megzavarásával fokozzák, vagy csökkentik a génexpressziót. Például proto-onkogének aktiválásával iniciálhatják az onkogenezist. Vagy ők maguk is promóterként részt vehetnek ezen gének átírásában [91]. Továbbá a regulátor régiók közelében landolva átterjesztik a saját epigenetikai mintázatukat a szomszédos régiókra, mely géncsendesítést eredményezhet [92]. Az inszerciók tumorszupresszor géneket is kikapcsolhatnak, melynek bizonyított pozitív hatása van a tumorok kialakulására [93].

A LINE-1 inszerciók alternatív splincingot és a géntermék módosulását is eredményezik, amennyiben az intronikus régiókat érintik. A hibás transzkriptumok számos genetikai elégtelenség magyarázatául szolgálnak és jelenlétüket kimutatták különböző rosszindulatú tumorokban [94].

A LINE-1 ORF2 endonukleáz a retrotranszpozíció integrációs fázisában duplaszálú DNS törést (DSB) képez véletlenszerű helyeken a DNS szálon [95], [96]. Szomatikus sejtekben a DSB javítása nem-homológ vég illesztéssel (NHEJ), míg csírasejtekben homológ rekombináción alapuló hibajavító mechanizmussal történik. Az NHEJ hibajavítás során nagyobb eséllyel történnek mutációk, így a szomatikus sejtek jobban ki vannak téve a genetikai instabilitás veszélyének [97].

A LINE-1 és Alu elemek a humán genomban fokozzák a nem allélikus homológ rekombináció (NAHR) gyakoriságát. A NAHR a homológ rekombinációnak egy olyan változata, amely nagyfokú hasonlóságot mutató (95%-97%) szekvenciák között játszódik le. Ismétlődő szekvenciák, mint a transzpozonok nagymértékben kitettek ennek a jelenségnek [98]. Ha az osztódás során tévesen ezek a szekvenciák vesznek részt a rekombinációban, különböző genomi átrendeződések, mint egész kromoszóma részek duplikációja vagy deléciója jön létre [99]. A transzpozonok által közvetített NAHR különböző tumorszupresszor gének mutációjával asszociált. Rekombináció az MLH1 és MLH2 génekben vastag- és végbélrákra, a BRCA-1 és BRCA-2 génekben mellrákra jellemző [100].

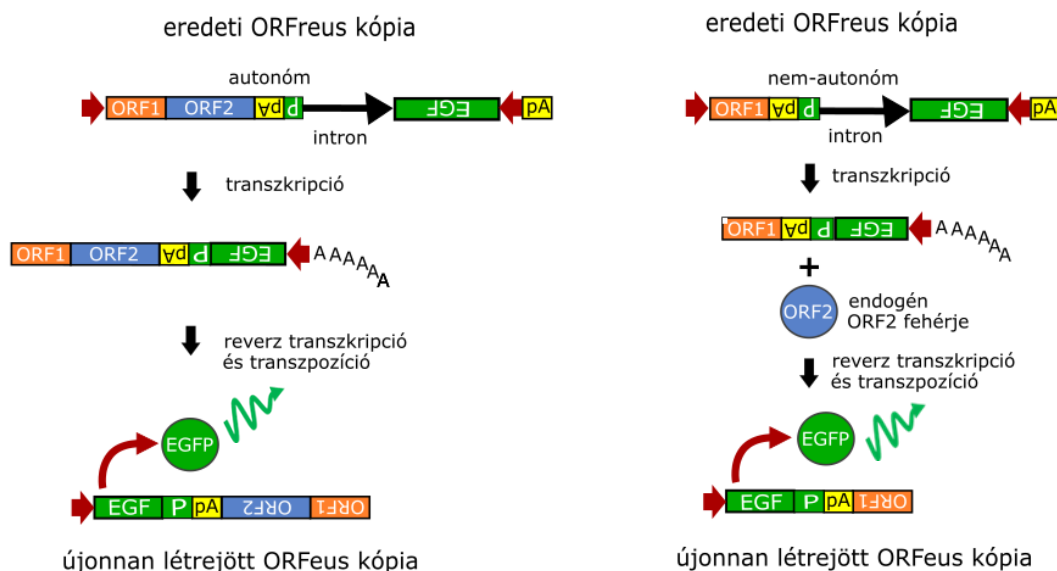
3.2.6. Az ORFeus riporter működése

Ahhoz, hogy pontosan megértsük a LINE-1 elemek genotoxikus hatását és a rákos elváltozásokban betöltött szerepét fontos, hogy vizsgálni tudjuk aktivitásukat szomatikus sejtekben. A szomatikus LINE-1 aktivitás vizsgálatára alkalmas és gyakran használt kísérleti állatok az egerek (*Mus musculus*). Az egér genomban a LINE-1 elemek aránya 20%-ra tehető, tehát hasonlóan magas, mint a humán DNS-ben [101]. Az egér és humán sejtekben továbbá a LINE-1 elemek működése és azt reguláló alapvető mechanizmusok megegyeznek. Egerekben is megfigyelhető például a retroelemek minimális aktivitása csíra sejtekben, de a szomatikus sejtekben az emberi szervezethez hasonlóan teljesen represszáltak [102]. Az egér sejtekből származó LINE-1 elemek képesek funkcionálni humán sejtekben is és fordítva [103].

A *de novo* retrotranszpozíciók kimutatása azonban nehézkes feladat a LINE-1 elemeknek a genomban nagyszámban való jelenléte miatt. Valamint a különböző celluláris szabályzó mechanizmusok miatt a LINE-1 retrotranszpozíciós események vizsgálata *in vitro* sejtmodellben és *in vivo* állatmodellben egyaránt problémás feladat. A probléma kiküszöbölésére és a LINE-1 retrotranszpozíciók sejtekben való egyszerű kimutatására és nyomon követésére hozták létre az ORFeus riportert. Ez egy magas aktivitású optimalizált

LINE-1 szekvencia, amely az endogén LINE-1 szekvenciákhoz képest az emlős genomokban legnagyobb mértékben előforduló és expresszálandó kodonokat tartalmazza. Erre az eredeti LINE-1 szekvencia transzkripciója során bekövetkező elongációs hiba miatt volt szükség [104]. A LINE-1 szekvencia 3' UTR régiójába egy riporter gént (zöld fluoreszcens fehérje, EGFP) építettek be antiszensz irányultságban a LINE-1 átírási irányához képest. A EGFP szekvenciát egy intron szakítja meg, melynek transzkripciós iránya viszont megegyezik a LINE-1 elemével. A mRNS érése során ennek az intronnak ki kell vágódnia. Ezt követően a szekvenciának reverz transzkripció kell átesnie és be kell integrálódnia a genomba ahhoz, hogy a szensz irányú EGFP mRNS intron mentes változata átíródhasson és funkcionális géntermék képződjön róla. Tehát ahhoz, hogy a sejtben működőképes, zöld fluoreszcens jelet adó EGFP fehérje expresszálandó le kell játszódnia a teljes LINE-1 retrotranspozíciós folyamatnak (5. ábra). A retrotranspozíció átesett riporter erős és tartós EGFP expressziót mutat az őt kifejező sejtekben, amit átörökítenek a leánysejtekbe [104].

Az ORFeus riporternek létezik egy nem-autonóm változata is, amely nem tartalmazza az ORF2 fehérjét kódoló szekvenciát. Mivel az ORF2 rendelkezik az endonukleáz és reverz transzkriptáz funkcióval, enélkül csak abban az esetben játszódik le a retrotranspozíció, ha rendelkezésre áll a sejt által termelt endogén ORF2 fehérje. Ennek segítségével információt kaphatunk az endogén LINE-1 kópiák expressziós állapotáról.

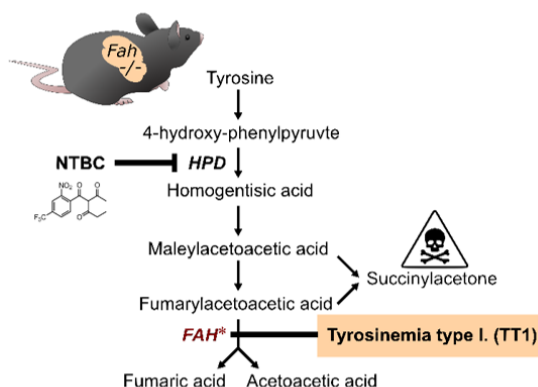


5. ábra: Az autonóm és nem-autonóm ORFeus riporter működése: Az ORFeus riporter egy szintetikus LINE-1 szekvencia, mely ORF1 (narancssárga), ORF2 (világoskék) és EGFP (zöld) fehérjéket kódol. A riporter két promótert (piros nyíl) és két poliA szignált tartalmaz (sárga). Az EGFP szekvenciát egy intron szakítja meg (fekete nyíl). A LINE-1 mRNS transzkripciója és érése során az intron kivágódik az EGFP szekvenciából. A reverz transzkripciót és integrációt követően fluoreszcens EGFP expresszálandó. A nem-autonóm ORFeus riporter nem tartalmazza az ORF2 fehérjét kódoló szekvenciát.

3.2.7. A LINE-1 aktivitás *in vivo* vizsgálata és annak nehézségei szomatikus sejtekben

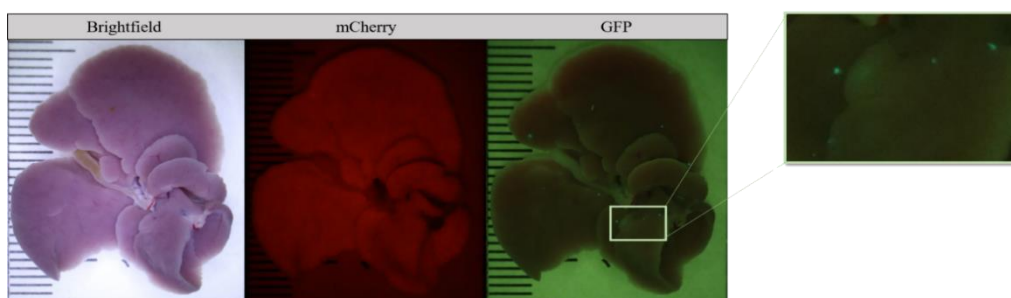
Az ORFeus riporter lehetővé teszi a LINE-1 retrotranszpozíció nyomon követését az őt kifejező sejtekben *in vitro* sejt kultúrán végzett kísérletek során. *In vivo* alkalmazása állatmodellben azonban további problémákat vet fel. Kézenfekvő lenne transzgenikus egereket létrehozni a vizsgálatokhoz, azonban mivel a LINE-1 retrotranszpozíció aktív az ivarsejtekben és a korai embriogenezis során a klasszikus csíravonalat célzó génbeviteli módszerek nem alkalmazhatók. Ebben az esetben az ORFeus riporter korai aktiválódása miatt a GFP pozitivitás tovább öröklődne az egyedfejlődés során az összes utódsejtbe és az egész transzgenikus állatot érintené. Így nem lehetne elkülöníteni azon sejteket, amelyek a szomatikus LINE-1 retrotranszpozíciós események következtében mutatnak EGFP pozitivitást.

Ezen probléma megoldására kutatócsoportunk kidolgozott egy alternatív módszert, mely alkalmazása során az ORFeus riportert szomatikusan juttatjuk felnőtt egerekbe. Kísérleteink során az egér ORFeus riporter használjuk (ORFeus-Mm) [105]. Az *in vivo* kísérletek során I. típusú tirozinémiában (TT1) szenvedő egerek májába juttatjuk az ORFeus riportert. A transzfekciót hidrodinamikai injektálással kivitelezük, mely ideiglenesen megnöveli a májsejtek membrán permeabilitását [106]. A TT1 egy öröklődő genetikai betegség, amely a *Fah* (Fumaril acetoacetát hidroláz) hibás működéséből adódik és májelégtelenséget okoz az érintett egyedekben. Az enzim a tirozin lebontási folyamat utolsó komponense, amely hibás működése a szukcinilaceton és egyéb káros metabolitok felhalmozódását eredményezi a májsejtekben [107]. A TT1-ben szenvedő egerek kezelés hiányában újszülött korban elpusztulnak. A TT1 kezelhető egy nitizinon (NTBC) nevű szerrel, amely a tirozin lebontási kaskádot a *Fah* előtt megszakítja és megakadályozza a káros lebomlási termékek akkumulálódását [108]. Génkiütéssel létrehoztunk egy *Fah* KO (*Fah*^{-/-}) egértörzset, amely a *Fah* gén második exonjától az ötödikig deléciót hordoz és TT1 fenotípust mutat (6. ábra). A *Fah* KO egerek májsejt állománya (mintegy 100 millió hepatocita) a génterápiás kezelést követően, a *Fah* korrigált májsejtekből kiinduló májgenerációnak köszönhetően, 2-3 hónap elteltével transzgenikus sejtekre cserélhető.



6. ábra: Az I. típusú tirozinémia: A *Fah* KO egerekben *Fah*^{-/-} gén hibás működése miatt a tirozin lebontási kaszkád megakad, ami a szukcinilaceton és egyéb káros metabolitok felhalmozódását eredményezi. Az NTBC megszakítja a *Fah* előtt a folyamatot, így nem akumulálnak a toxikus anyagok.

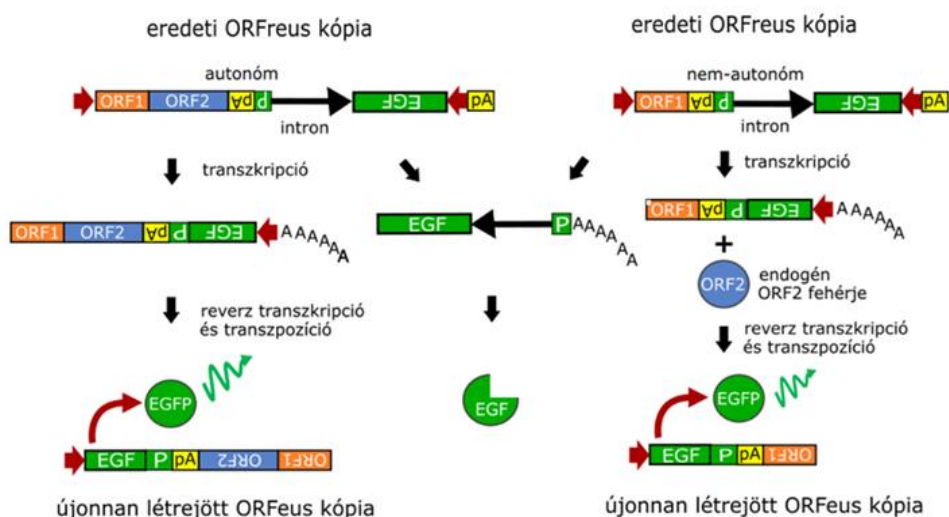
Kísérleteink során *Fah* KO egereken végzünk transzpozon alapú génterápiát. Az ORFeus riportert egy olyan plazmidon juttatjuk az egerek májába, amelyről a működőképes *Fah* terápiás gén is ki tud fejlődni. A transzgén hosszútávú stabil kifejezéséhez szükséges, hogy az expressziós kazettát a gazdasejt genomjába integráljuk. A kromoszómális géntranszfert Sleeping Beauty (SB) DNS transzpozonok segítségével végezzük. A transzpozon alapú génbeviteli rendszerek a széles körben használt virális vektorokkal ellentétben igen alacsony immunogenitást mutatnak [109]. A *Fah* terápiás gén ebben a rendszerben a májsejtekben pozitív szelekciós nyomást fejt ki. Azok a hepatociták, melyek genomjába sikeresen integrálódott és expresszálni képes az aktív *Fah* gén, osztódni kezdenek és regenerálják a májat. A *Fah* gén kifejeződése teszi lehetővé az ORFeus riportert kifejezését is [110].



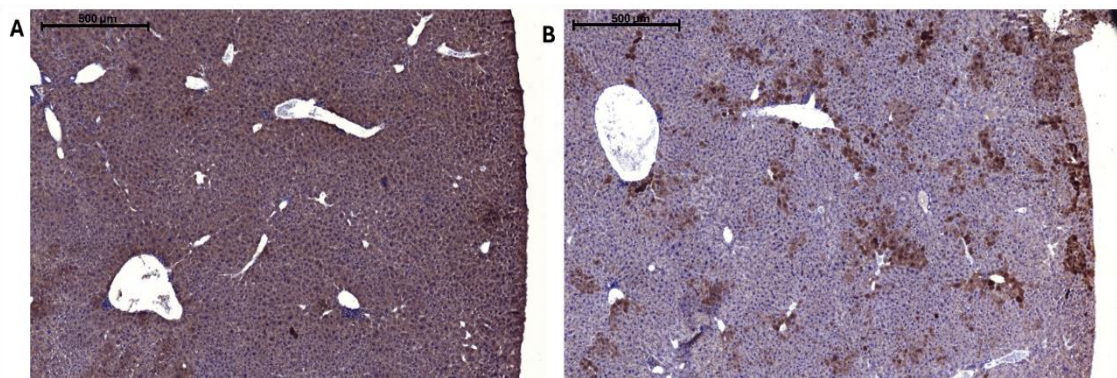
7. ábra: Brightfield és fluoreszcens sztereomikroszkóppal készült képek az *in vivo* génterápiával kezelt *Fah* KO egerek májáról, két hónappal az ORFeus riportert hordozó plazmid májat célzó génbevitel után. A *Fah* fehérjét expresszáló májsejtek regenerálták a májat és a sejtek csaknem 100%-a hordozza az ORFeus riportert. Az ORFeus transzpozíciós eseményeket hordozó májsejtek EGFP pozitivitást mutatnak.

Ha retrotranszpozíció játszódik le, az ORFeus riporterről kifejeződik az EGFP fehérje is, így a repopulált májszövetben a retrotranszpozíciós eseményeket hordozó májsejtek EGFP pozitivitást mutatnak (7. ábra). Ideális esetben az EGFP pozitívitas az ORFeust expresszáló sejtekben immunhisztokémiával (IHC) vizsgálható. A sejtekben azonban anélkül képződnek

parciális EGFP polipeptid fragmentek, hogy lejátszódna a retrotranszpozíció. Az ORFeus riporterben két ellentétes irányú promóter található. Az egyik a szekvencia elején, a másik pedig az EGFP mellett. A transzkripció mindkét promóterről megindul, amely két mRNS-t eredményez. A LINE-1 szekvenciával azonos irányultságban elhelyezkedő intron az első mRNS érése során kivágódik. A másik esetében az intron megmarad és a transzláció leállítását okozza egy benne található STOP kodon miatt. Így erről a mRNS-ről részleges, nem fluoreszkáló EGFP fehérje képződik (8. ábra). Ezek az EGFP-t kódoló szekvencia első exonjáról transzlálódó fehérje darabok immunogén epitópokat hordoznak, melyekhez a kereskedelmi forgalomban kapható EGFP specifikus antitestek kötődni képesek. Ez fals pozitív eredményt mutat IHC során. A megfestett metszeteken háttér festődés jelenik meg, ami miatt a ténylegesen retrotranszpozíciós eseményeket hordozó és teljes fluoreszcens EGFP fehérjét kifejező sejtek kvantifikációja és az eredmények pontos kiértékelése nem lehetséges (9. ábra).



8. ábra: Az ORFeus riporter két ellentétes irányú promótert tartalmaz (piros nyíl), mely következtében kettő, poliA farokkal (sárga) végződő mRNS íródik át. A LINE-1 mRNS-ből az intron szensz irányultsága miatt a mRNS érése során kivágódik. Az EGFP mRNS-ben megmaradó intron egy STOP kodont tartalmaz, mely a transzláció leállítását és részleges, nem fluoreszcens EGFP fehérje képződését okozza.



9. ábra: EGFP immunfestése az 1. (A) és 2. (B) specifikus antitesttel a regenerált májszöveten 3 hónappal a hidrodinamikai injektálást követően. A parciális EGFP fragmentek miatt nem csak a ténylegesen retrotranszpozíciós eseményeket hordozó és teljes működőképes EGFP-t expresszáló sejtek festődtek.

4. Célkitűzés

Kutatásunk célja volt megszüntetni az immunhisztokémia során felmerülő fals EGFP pozitivitás és a metszeteken megjelenő háttérfestődés problémáját. Valamint egy olyan optimalizált immunhisztokémia alapú eljárást kidolgozni, amely lehetővé teszi a LINE-1 retrotranszpozíciós aktivitást mutató szomatikus sejtek pontos kvantifikációját. Ehhez célunk volt egy olyan újgenerációs ORFeus konstrukció tervezése és létrehozása, amely módosításokat hordoz az EGFP szekvenciában. Így, ha az EGFP génről képződnek is csonkolt fehérje fragmentek, ezek nem hordozzák az immunogén epitópokat, amelyekhez az EGFP specifikus antitestek kötődni képesek IHC során. Célul tűztük ki a létrehozott másodgenerációs riporter sejt kultúrában és állatmodellben végzett kísérletekhez alkalmas plazmidokba klónozását, valamint működőképességének és retrotranszpozíciós aktivitásának vizsgálatát *in vitro*, szövetkultúra esszé segítségével, valamint *in vivo*, egérmodellen végzett kísérletek során

5. Anyag és módszer

5.1. A másodgenerációs ORFeus riporter konstrukció létrehozása *in vitro* és *in vivo* kísérletekhez

Az *in vitro* és *in vivo* kísérletek során használt másodgenerációs ORFeus riportert hordozó plazmid konstrukciókat klasszikus molekuláris klónozási eljárás alapján készítettük el. Az új ORFeus riportert tartalmazó plazmidról az inszertet kivágtuk és már korábbi sejtenyészetben és állatmodellben végzett kísérletek során használt vektorokba klónoztuk.

A klónozás során használt plazmidok:

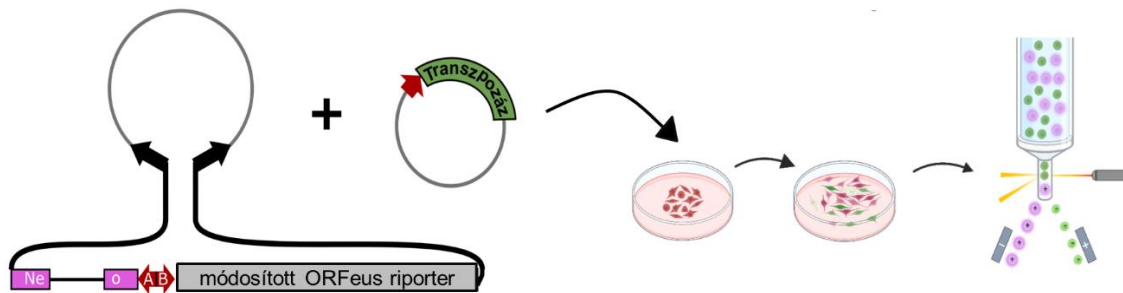
- 1. Inszert: *pUC57 simple mORFeus-delORF2-EGFP-intron-shifted*
- 2. *In vitro* vektor: *pUC57 simple-SB-ITRs wt -HADHA-neo-mir-HADHB-MCS for ORFeus*
- 3. *In vivo* vektor: *pUC57 simple-PB-ITRs wt-HADHA-mCherry-EF1 intron-T2A-Fah-HADHB-MCS mod*

Az inszertet és a vektorokat restriktációs endonukleáz enzimekkel emésztettük 37 °C-on 2 órán keresztül, majd 1%-os agaróz gélen futtattuk (110 V, 30 perc). Az izolátumokat a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) kit segítségével nyertük vissza a

gélből, majd T4 ligáz enzimmal összeligáltuk. A ligátumokat DH5-Alfa E. Coli (*Escherichia coli*) kompetens baktériumtörzsbe transzformáltuk és a baktériumokat 37°C-on növesztettük egy éjszakán keresztül. A felnőtt baktérium kolóniákat 3 ml LB tápoldatba oltottuk át és a 37 °C -os inkubálást követően a plazmid DNS tisztítást a NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) kit segítségével végeztük el a gyártó utasításai szerint. A szövetkultúra kísérletekhez a plazmid DNS-ből Midiprepet készítettünk. A transzformált baktérium kolóniákat 100 ml LB tápoldatban növesztettük és NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) segítségével preparáltuk belőlük a plazmid DNS-t. Az *in vivo* kísérletekhez Endo free Maxiprepet készítettünk. A kolóniákat 400 ml LB tápoldatba oltottuk és növesztettük, majd a NucleoBond Xtra Maxi Plus EF Kit (Macherey-Nagel) segítségével készítettük el a Maxiprepet a gyártó instrukciói szerint. A klónozás sikerességét restriktációs enzimekkel való teszteléssel ellenőriztük.

5.1.1. *In vitro* transzfekció

A sejtkultúra kísérleteket HepG2 (Humán Hepatocelluláris Karcinóma, ATCC) sejteken végeztük. A sejteket 10% FBS-t (magzati marhaborjú szérum, Gibco) és 1% penicillin-sztreptomocint (P-S; HyClone) tartalmazó DMEM (Biosera) tápoldatban neveltük 37 °C hőmérsékletű és 5% CO₂-ot tartalmazó inkubátorban. A transzfekció előtt 4 órával a tápoldatot antibiotikum mentesre cseréltük. A transzfekciót 500 ng ORFeus konstrukció plazmiddal és 50 ng hiperaktív SB transzpozáz helper plazmiddal (SB100x) végeztük, FuGENE® HD (Promega) transzfekciós reagens kíséretében a gyártó útmutatásai alapján. A transzfekcióból három ismétlést készítettünk és az eredeti nem intron-shifted ORFeus konstrukciót használtuk kontrollként. Ezen kívül még két mCherry fluoreszcens fehérje markert tartalmazó plazmiddal transzfektált kontrollt is készítettünk. Az egyik kontrollhoz SB transzpozáz helper plazmidot is adtunk. Ez szolgált a transzfekció hatékonyságának ellenőrzésére, valamint az antibiotikum rezisztencia negatív kontrolljaként. A sikeresen transzfektált sejteket 800 µg/ml neomicint (G418, Biosera) tartalmazó tápoldatban szelektáltuk. Az mCherryt hordozó plazmid nem tartalmazott neomicin rezisztencia gént, így ezek a sejtek a szelekciót követően elpusztultak. A sejtenyészetet nyolc hétig tartottuk fent és minden második-harmadik napon passzáltuk őket. Ennek során először 10 ml PBS oldattal (foszfáttal pufferolt sóoldat) mostuk őket, majd 1 ml tripszint mértünk hozzájuk és 10 percig inkubáltuk őket. A feltripszinezett sejtek nagy részétől megszabadultunk és a maradékra 10 ml friss tápoldatot mértünk.



10. ábra: *In-vitro* transzekció és az azt követő áramlási citometria

5.1.2. Áramlási citometria

A transzekciót követően négy, hat és nyolc hét után áramlási citometriával mértük meg az EGFP pozitív sejteket (10. ábra). A sejteket először 10 ml PBS oldattal mostuk, majd 10 percig 1 ml tripszinben inkubáltuk 37 °C-on. Ezután 6 ml DMEM tápoldatban felfuszpendáltuk és 4°C-on 4 percig 1000 rpm-en centrifugáltuk őket. A sejtpelletet 5 ml PBS oldatban reszuszpendáltuk és 70 µm-es szűrőn átszűrtük. DMEM tápoldatot mértünk hozzájuk és 1 ml sejtsuszpenziót Eppendorf csőbe tettünk. Az áramlási citometriai mérésekhez 500 µl sejtsuszpenziót kevertünk össze 5 µl 1 mg/ml propídium-jodiddal, amely az elhalt sejtek megfestésére szolgált. Az EGFP pozitív sejtek arányát BD FACSAria™ Fusion Flow Cytometer segítségével mértük meg. Az analízishez a BD FACSDiva™ software-t használtuk. Az eredményeket Microsoft Excel és R stúdió segítségével értékeltük ki [111].

5.2. Az intron-shifted konstrukció tesztelése *in vivo* modellben

5.2.1. Állatok gondozása

Az *in vivo* kísérletekhez felhasznált egerek a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Központi Állatházában voltak tenyésztve és gondozva. Kórokozó mentességük minden harmadik hónapban ellenőrizve volt a FELASA irányelvei szerint. Az egerek 22 °C-on voltak tartva 12 órás világos/sötét periódusokban. Élelemhez és vízhez folyamatosan hozzáfértek. A *Fah* KO egerek itatóvize 8 mg/l NTBC-t (Nitizinin, Orfadin®) tartalmazott. Minden kísérleti eljárás az Biológiai Kutatóközpont Állatkísérleti Etikai Bizottsága (IACUC) által elfogadott protokoll szerint történt. A kísérletek során használt egér törzs C57BL/6N-*Fah*^{tm1(NCOM)Mfgc/Biat} megtalálható az EMMA-ban (European Mouse Mutant Archive) a EM:10787 szám alatt.

5.2.2. *In vivo* génbevitel

Az *in vivo* transzpozon alapú génterápiát 6-8 hetes Fah KO egereken végeztük el. Az intron-shifted ORFeus riportert hordozó plazmidot májat célzó hidrodinamikai injektálással a farkukon keresztül juttattuk az egerekbe. Az injektálás előtt melegvízben áztattuk az egerek farkát, a farok erek kitágulása érdekében. A transzfekeciós reagenst 5-8 perc alatt fecskendeztük a laterális farok vénába. Az oltó elegy térfogata a testtömeg körülbelül 10%-a volt (ez 2 ml-nek felel meg egy 20 g tömegű állat esetében). A reagens elkészítéséhez a plazmid DNS steril Ringer oldatban (0,9% NaCl, 0,03% KCl, 0,016% CaCl₂) volt hígítva. Minden állatba 4 µg hiperaktív SB transzpozáz helper plazmid (*SB100x*) és 50 µg ORFeus riportert hordozó plazmid került. A transzfekeciót követően az állatok vizéből megvonásra került az NTBC.

5.2.3. Sztereomikroszkópos makrovizualizáció

Három hónappal a transzfekeciót követően az állatokat elaltattuk, majd a májukat egészben eltávolítottuk. A májszövet feldolgozása előtt az egész szervről felvételt készítettünk fluoreszcens sztereomikroszkóppal, az Olympus SZX12A műszer használatával. A mikroszkóp 100-W Mercury lámpával és speciális filterrel volt felszerelve a GFP és az mCherry fehérjék fluoreszcens jelének detektálására.

5.2.4. Immunhisztokémia

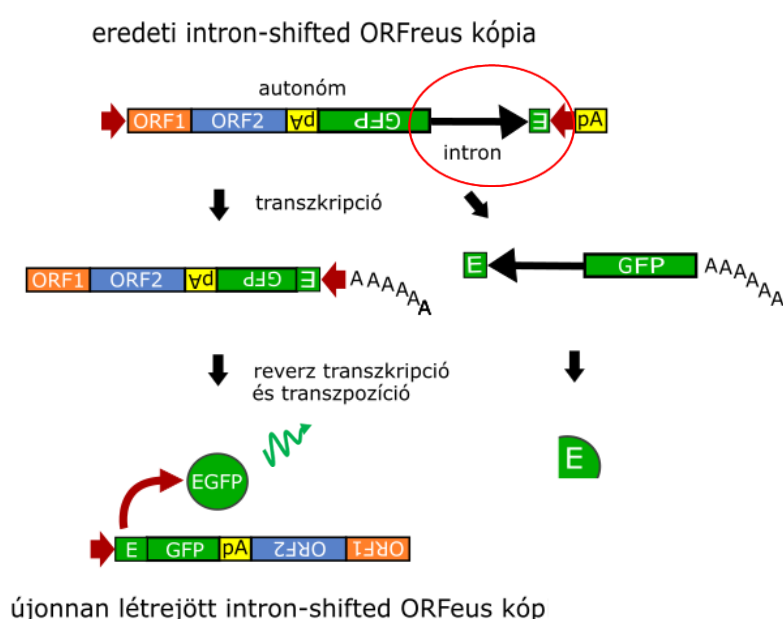
A szerveket steril PBS oldatban mostuk, majd egy éjszakán át 4%-os formalinban fixáltuk. Paraffinba ágyazást követően 5 µm-es metszeteket készítettünk belőlük. A metszeteket 56°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. Deparaffinálást követően, az antigén feltárást Tris/EDTA pH 9 feltáró oldatban végeztük 95°C-on 10 percig. 30 perc 5% BSA pufferben történő blokkolást követően 30 percig inkubáltuk az elsődleges antitesteket 1:500 hígításban. Másodlagos antitestként a *Novolink™ Max Polymer Detection System Kit* Anti-nyúl Poly-HRP-IgG-t használtunk 30 perces inkubáció során. A reakciók előhívását DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromogén használatával végeztük. A metszeteket ezt követően Hematoxilinnel festettük, dehidráltuk, majd fedtük. Az alkalmazott elsődleges antitestek a következők voltak: -Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) antitest, nyúl, poliklonális (Abxexa, Katalógus szám: abx122699_100 µg)

-Green Fluorescent Protein (EGFP) antitest, nyúl, poliklonális (Sigma, Merck, Katalógus szám: G1544)

6. Eredmények

6.1. Az intron-shifted ORFeus konstrukció

Kutatásunk során létrehoztuk a másodgenerációs intron-shifted ORFeus riportert az IHC során fellépő nem kívánatos antigén-antitest kapcsolódás problémájának megoldására. Az eredeti ORfeus konstrukció *in vivo* használata szomatikus egér májsejtekben csonkolt EGFP polipeptidek transzlációját eredményezte a riporter inaktív állapotában. Ezért módosításokat hajtottunk végre az EGFP kódoló szekvenciában. Az intront elcsúsztattuk az aminosav sorrend megváltozása nélkül. Az ORFeus riporterben két promóter található. A LINE-1 szekvenciához képest antiszensz irányultságú EGFP az egyik promóter régió mellett foglal helyet. A riporter működése során az átírás mindkét promoterről megindul, amely egy intron mentes de antiszensz EGFP szekvenciát tartalmazó LINE-1 mRNS és egy intront visszatartó szensz EGFP mRNS képződését eredményezi. Utóbbi esetben az EGFP szekvencia átírása egy, az intronban található STOP kodon miatt az első exon végénél leáll. Az intron-shifted konstrukció transzlációja során egy rövidebb polipeptid képződik (**11. ábra**). Csak az EGFP szekvencia eleje fejeződik ki, amely nem hordozza az antitestek kötődési helyéül szolgáló immunogén epitópot. Az intron-shifted konstrukciónak létrehoztuk a nem-autonóm változatát is, amely nem tartalmazta az ORF2 fehérjét kódoló szekvenciát.



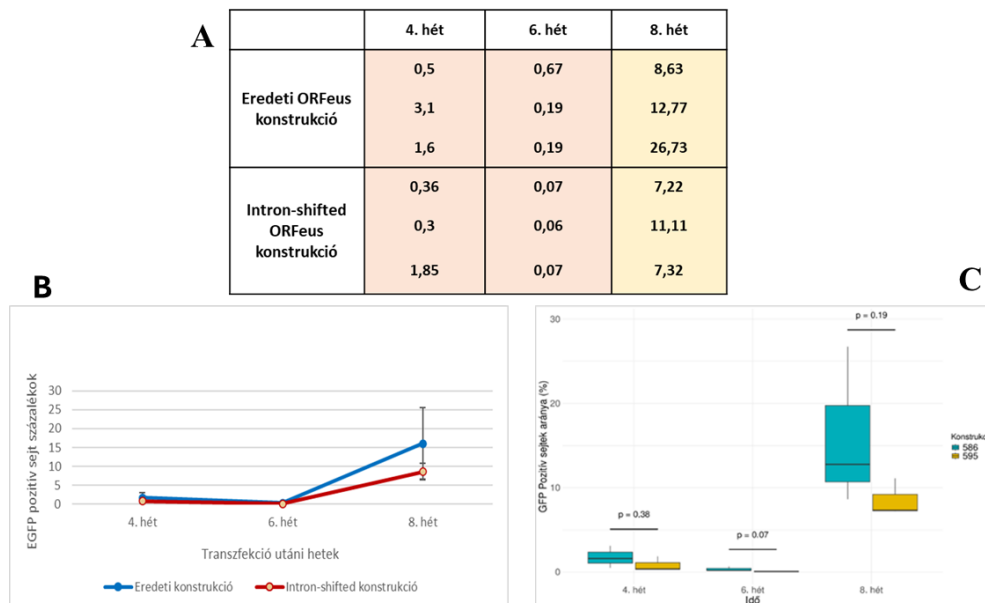
11. ábra: Az intron-shifted ORFeus riporter: Az EGFP szekvenciában található intron pozíciója módosult, aminek következtében a szekvenciáról képződő parciális, nem fluoreszcens EGFP fragmentek nem tartalmazzák az EGFP specifikus antitestek kötődési helyéül szolgáló immunogén epitópot.

6.2. Az intron-shifted ORFeus konstrukció tesztelése *in vitro*

Az intron-shifted ORFeus riportert tartalmazó expressziós kazettát pUC57 simple plazmid MCS (multiple cloning site) helyére klónoztuk Sleeping Beauty (SB) Inverted Terminal Repeat (ITR) szekvenciák közé. Az ITR régiók szolgáltak az SB transzpozáz hasítási helyéül a plazmidon, valamint az expressziós kazetta integrálási helyéül a gazda genomban. A plazmid gerinc rendelkezett replikációs origóval és ampicillin rezisztencia génnel, mely a sikeresen transzformált *E. coli* baktérium sejtek szelekciójára szolgált. Antibiotikumot tartalmazó táptalajban csak a plazmidot felvett sejtek tudtak túlélni. Az expressziós kazetta tartalmazta a humán eredetű HADHA/B kétirányú promótert, amely mindkét irányban ugyanolyan hatékonysággal hajtotta a transzkripciót. A mitokondriális promóter eredetileg a hidroxiacil-CoA dehidrogenáz háromfunkciós multienzim komplex alfa (HADHA) és béta (HADHB) alegységének átírásáért felel [112]. A promóter A oldalán a neomicin rezisztencia gén foglalt helyet, amely az expressziós kazettát integrálni és kifejezni képes májtumor sejtek szelekciójához volt szükséges. A gént egy intron szakította meg, amely helyére microRNS szekvencia helyezhető. Ennek funkciója különböző gének csendesítése RNS interferencia révén, azonban ez a konstrukció nem tartalmazott ilyen szekvenciát. A bipromóter B oldala felelt az ORFeus riporter átírásáért. A plazmid klónozását követően az elkészült konstrukció a következő nevet kapta: *pUC57 simple-SB ITRs wt-HADHA-neo miR-HADHB-mORFeus dORF2-EGFP Int Shifted*

Az intron-shifted ORFeus riportert hordozó plazmidot humán májtumor sejtekbe juttattuk és a transzfekció után négy, hat és nyolc héttel áramlási citometriával mértük meg a fluoreszcens jelet adó sejteket. A GFP pozitivitás alapján a transzfekció sikeres volt. A sejtek felvették a plazmidokat és az SB transzpozáz beintegrálta az expressziós kazettát a genomjukba [113]. A gazdasejtben a retrotranszpozíció le tudott játszódni, amely működőképes fluoreszcens EGFP fehérje expressziót eredményezett. Az EGFP pozitív sejtszám alapján összehasonlítottuk a retrotranszpozíciós rátát az intron-shifted és az eredeti konstrukcióval transzfektált sejtekben. A három mérés alapján az EGFP pozitív sejtszám arányok jól összehasonlíthatóak voltak (**12. ábra**). Az intron-shifted konstrukció és a kontroll esetében is hasonló értékeket kaptunk, az eredmények jól korreláltak (**12. ábra**). Statisztikai analízis alapján (Mann-Whitney-próba, R stúdió) nem találtunk szignifikáns különbséget a két konstrukcióval transzfektált sejtek retrotranszpozíciós rátájában (**12. ábra**). Ezek alapján a

másodgenerációs ORFeus riporter konstrukciót fel tudtuk használni a további kísérletek során a szomatikus LINE-1 retrotranszpozíciós aktivitás mérésére.



12. ábra: (A) Intron-shifted (piros) és nem intron-shifted (kék) ORFeus konstrukciókkal transzfektált, EGFP pozitív sejtek százalékos összehasonlítása. A sejtek négy, hat és nyolc hét után, áramlási citometriával lettek mérve. (B) EGFP pozitív sejtsszázalékok négy, hat és nyolc héttel transzfekció után. (C) Az intron-shifted (595) és eredeti (586) ORFeus konstrukcióval transzfektált EGFP pozitív májsejtek összehasonlítása négy, hat és nyolc héttel a transzfekció után. Statisztikai analízis (Mann-Whitney-próba, R stúdió) alapján nincs szignifikáns különbség a két konstrukcióval transzfektált sejtek retrotranszpozíciós rátájában.

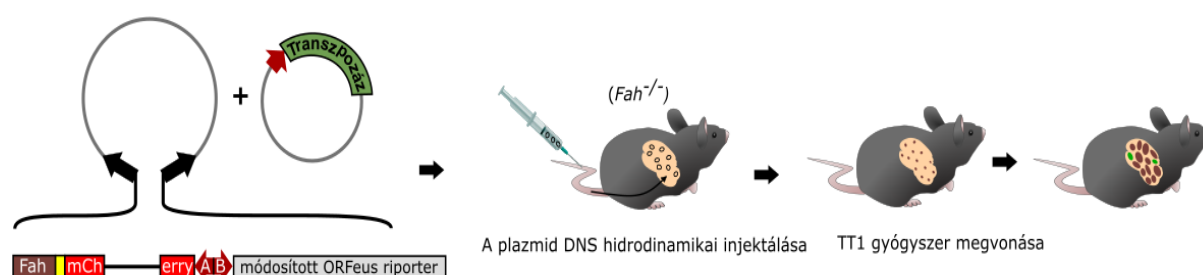
6.3. Az intron-shifted ORFeus riporter tesztelése *in vivo*

Az *in vivo* intron-shifted ORFeus konstrukció szintén a pUC57 szimpla plazmid és az intron-shifted ORFeus riportert tartalmazó expressziós kazetta felhasználásával készült el. Ebben az esetben az expressziós kazetta mCherry fluoreszcens fehérje markert és *Fah* terápiás gént tartalmazott a HADH promóter A oldalán. Az mCherry szolgált a konstrukciót felvett májsejtek szelekciójára. Az mCherry szekvencia tartalmazott egy intront, mely szintén microRNS beépítési helyéül szolgált, azonban ebbe a konstrukcióba sem építettünk ilyen szekvenciát. A klónozást követően a konstrukció a következő nevet kapta: *pUC57 simple-PB ITRs wt-HADHA-mCherry-T2A-Fah-HADHB-mORFeus dORF2-EGFP Int Shifted*

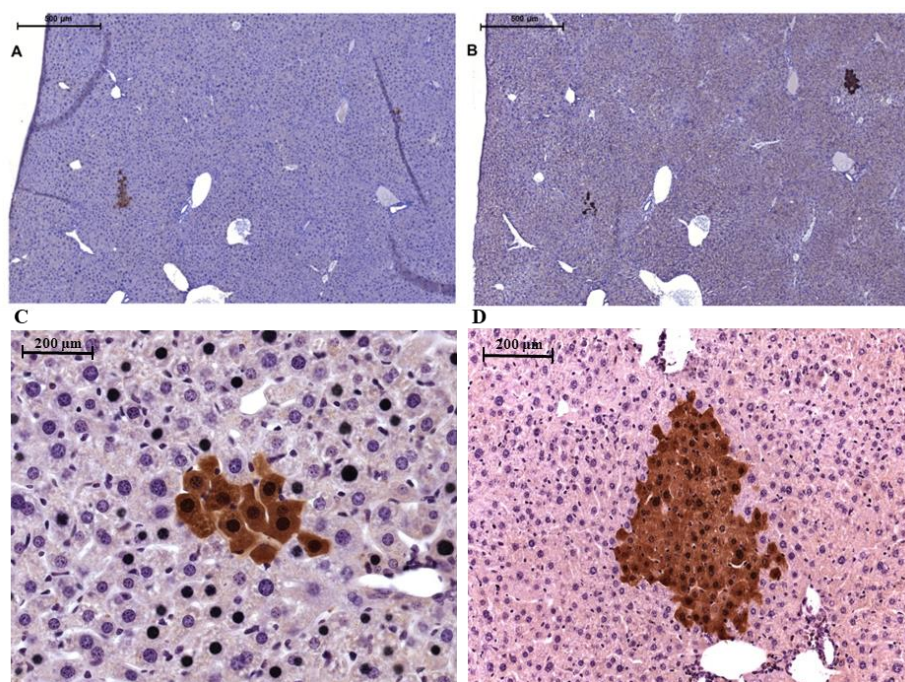
Az elkészült plazmid konstrukciókkal és az SB transzpozáz helper plazmiddal *Fah* KO egereket oltottunk be májat célzó hidrodinamikai injektálással (**13. ábra**). A génbevitelt követően megvontuk az állatoktól a TT1 tünetek enyhítésére szolgáló NTBC-t. Azok a májsejtek, amelyekben a plazmidok felvételre kerültek és megtörtént a géntranszfer, képesek

voltak a működőképes *Fah* génterméket expresszálni. Így ezek az állatok nem pusztultak el. A májsejtek a pozitív szelekciós nyomás miatt osztódtak és regenerálták a májat.

A transzfekció után három hónappal az állatokat feláldoztuk és a májukat eltávolítottuk további vizsgálatok céljából. A repopulált májszövetből metszeteket készítettünk és immunfestettük őket a korábbi kísérletek során alkalmazott EGFP specifikus antitestekkel. Az új metszeteken nem tapasztaltunk háttér festődést (**14. ábra**). A parciális EGFP polipeptidekhez nem tudtak kötődni az antitestek. Tehát már csak azok a sejtek festődtek, amelyek ténylegesen LINE-1 retrotranspozíciós események következtében termeltek működőképes fluoreszcens EGFP fehérjét.



13 ábra: Az ORFeus riporter in-vivo transzfektálása májat célzó, hidrodinamikai injektálással. A kromoszómális génátvitel a PiggyBac DNS transzpozon rendszer segítségével történik. A TT1 gyógyszer megvonása után a májregeneráció indul ki a riportert hordozó májsejtekből.



14. ábra: EGFP immunfestése az Abbexa (A) és a Merck (B) EGFP specifikus antitestekkel a regenerált májszöveten 3 hónappal az intron-shifted ORFeus konstrukció génbevitel után. A parciális EGFP fragmenteken már nem találhatók immunogén epitópok, így csak a ténylegesen retrotranspozíciós eseményeket hordozó, teljes EGFP fehérjét expresszáló sejtek festődtek. (C) és (D) immunfestett EGFP pozitív májsejt kolóniák nagyobb nagyítással.

7. Megbeszélés

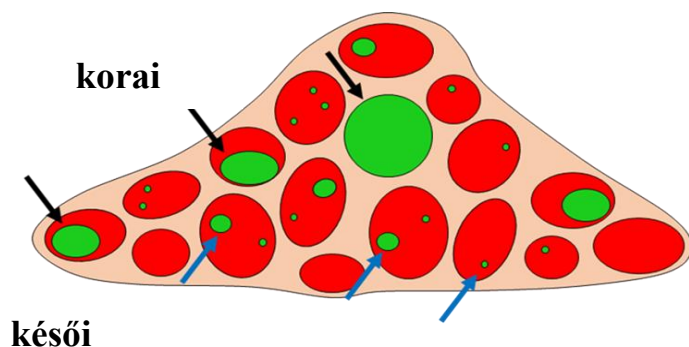
A LINE-1 retrotranszpozonok autonóm retrotranszpozíciós aktivitása bizonyítottan fokozza a genomi instabilitást az őket kifejező szomatikus sejtekben. A retrotranszpozonok genotoxikus hatása direkt vagy indirekt módon részt vesz különböző tumoros elváltozások kialakulásában. Driver mutációk képzése révén akár közvetlenül katalizálhatják a karcinogenezis folyamatát, például tumor szupresszor gének inaktiválásával vagy proto-onkogének indukálásával [90]. A LINE-1 elemek szerepe tehát nem elhanyagolható a különböző rákos megbetegedések vizsgálata és a tumor képződés okának felderítése során. Ahhoz, hogy pontos képet kapjunk a karcinogenezis mechanizmusáról elengedhetetlen a retrotranszpozíciós események nyomon követése és az általuk okozott genetikai változások kimutatása.

Ehhez szükséges, hogy nyomon tudjuk követni aktivitásukat szomatikus sejtekben. Az ORFeus riporter lehetővé teszi a retrotranszpozíciós események kimutatását fluoreszcens fehérje markerek segítségével. Széles körben alkalmazzák *in vitro* szövetkultúrán végzett kísérletek során. A legtöbb adatunk a LINE-1 retrotranszpozícióra vonatkozóan ezekből kísérletekből származik. *In vitro* kísérletek során legtöbbször tumoros sejtvonalakat alkalmaznak. A retrotranszpozíciót szabályzó celluláris folyamatok felderítését célzó vizsgálatok során azonban problémás immortalizált sejteket használni. Ezekben a sejtekben már bizonyos fokig megváltozott módon működnek e szabályozó rendszerek, így a sejtek megengedőbbek a normálistól eltérő folyamatokkal szemben [33]. Ezek a modellek tehát nem reprezentálják megfelelően az élő szervezetekben lévő körülményeket.

Az emberi szervezetben lejátszódó folyamatok modellezése érdekében fontos, hogy *in vivo* körülmények között is vizsgálni tudjuk a LINE-1 aktivitást. Erre a célra rendelkezésre állnak különböző kísérleti állatok, melyek közül az egerek a leggyakrabban használtak. Ezek az állatok viszonylag egyszerűbb körülmények között tarthatók és kevésbé restriktívek a szabályok a használatukat illetően. Fontos megjegyezni, hogy a laboratóriumi körülmények között tartott egereket más hatások érik, mint az embereket körülvevő változatos és komplex környezetben. Az olyan faktorok, mint a stressz, értendő és különböző kórokozókkal szembeni kitettség mind hatással vannak az emberi szervezetben lejátszódó folyamatokra, amit figyelembe kell venni az állatokon végzett kutatások során. Ezen kívül a faji különbségek miatt bizonyos fokig korlátozott az egér modellben végzett kísérletek eredményeinek humán

szervezetre történő direkt extrapolálhatósága. Alapvetően azonban a LINE-1 aktivitás és annak szabályozása megegyezik a humán és egér szervezetben. Így jól alkalmazhatók a szomatikus LINE-1 aktivitás modellezésére, melynek legáltalánosabb módszere transzgenikus állatok létrehozása csírasejteket célzó génbevitellel. Az ORFeus riporter csírasejtes transzgenezis módszerrel történő használatát azonban limitálja a csírasejtekben és a korai embrióban jelenlévő számottevő LINE-1 aktivitás. Kutatásaink során ezért az általunk kifejlesztett TT1 egér modell felnőtt egyedein végzünk géntranszfert májsejteket célozva. Ebben a modellben a génbevétel során az ORFeus riportert kifejező hepatociták pozitív szelekciós előnyben vannak a kapcsolt terápiás génexpresszió által, és belőlük kiindulva az egerek májának teljes repopulációja történik meg. Ez közel 100 millió riportert hordozó sejtet jelent kísérleti állatonként.

A regenerált májszövetben az ORFeus riporter retrotranszpozíciós eseményeket hordozó sejtek EGFP pozitivitást mutatnak. Többféle módszert alkalmazhatunk az EGFP fehérjét expresszáló sejtek vizsgálatára. Sztereomikroszkóppal képesek vagyunk detektálni az EGFP pozitív kolóniák által kibocsátott fluoreszcens jelet. Azonban ezzel a módszerrel csak a máj felszínén lévő, korai retrotranszpozíciós események vizualizálhatók. Ezek a korai események látható kolóniákat eredményeznek a májregeneráció során lejátszódó számos osztódás miatt, de a később lejátszódó LINE-1 retrotranszpozíciós események nem vizsgálhatók vele, hiszen pár sejtes állapotban nem ismerhető fel egy kolónia ezzel a módszerrel (15. ábra).



15. ábra: A repopulált májszövetben a korai és késő retrotranszpozíciós események következtében EGFP pozitív májsejtek.

A májszövet immunfestése lehetővé teszi az EGFP pozitív sejtek megjelölését specifikus antitestekkel. Ezzel a módszerrel a máj mélyebb rétegeiben lévő EGFP fehérjét expresszáló májsejt populációk is megfesthetők és vizsgálhatók. Az eredeti ORFeus riporter rendszert használva azonban a kereskedelmi forgalomban lévő antitestek minden EGFP sejtet

megfestenek. A metszetek háttér festődése miatt az eredeti ORFeus konstrukció használata nem tette lehetővé az EGFP pozitív sejtszám pontos meghatározását.

Ezért sikeresen létrehoztuk a másodgenerációs intron-shifted ORFeus riportert, amelyben módosítottuk az EGFP szekvenciában található intron pozícióját. Az új konstrukciót először *in vitro* májtumor sejtvonalon teszteltük. Az EGFP pozitív sejtek aránya nem különbözött szignifikánsan az eredeti konstrukcióval transzfektált sejtekhez képest. Tehát az EGFP szekvenciában végzett változtatások nem befolyásolták számottevően az új konstrukció retrotranszpozíciós aktivitását. Az új konstrukciót ezután *in vivo* egérmódelben is leteszteltük. A transzfektált egerek májából készített metszetek festése során már nem tapasztaltunk háttérfestődést. A májsejtekben már nem expresszáldtak olyan parciális EGFP fragmentumok, amelyekhez az antitestek kötődni tudtak volna. Egyértelműen el tudtuk különíteni azokat a sejteket, amelyekben lejátszódott a LINE-1 retrotranszpozíció és teljes EGFP fehérje képződött.

Másodgenerációs ORFeus riporterünk használatával sikerült létrehozni egy optimalizált immunhisztokémiai esszét, amely lehetőséget biztosít a szomatikus LINE-1 aktivitást mutató sejtek kvantifikációjára és az eredmények pontos kiértékelésére. A sejtszámlálásához fejlesztés alatt áll egy új bioinformatikai mesterséges intelligencia alapú kép analízis eljárás is, amellyel képesek leszünk az EGFP pozitív sejteket egyenként leszámolni. Ezen eredmények felhasználásával hosszú távú célunk kidolgozni egy olyan toxikológiai eljárást, amellyel a szomatikus LINE-1 aktivitást fokozó anyagok kiszűrhetők lesznek. Minden olyan anyag, amely LINE-1 aktivitást indukál potenciális karcinogén lehet. Fontos tehát kiszűrni a különböző környezeti hatások, gyógyszerek és kemikáliák lehetséges retrotranszpozonokon keresztül érvényesülő genotoxikus hatását.

Rendelkezésre állnak általánosan használt genotoxicitás szűrő esszék, amik alkalmasak ugyan különböző DNS károsító szerek tesztelésére, de a LINE-1 aktivitásra gyakorolt hatásuk nem mutatható ki velük. Ezek a módszerek bár nagy fokú érzékenységgel működnek, általában nem specifikusak és gyakran csak nagyobb kromoszóma területre kiterjedő genomi változások vagy egyféle pontmutáció kimutatására alkalmasak. Ilyenek például a különböző gén mutációs esszék, kromoszóma aberrációs tesztek, mikronukleusz tesztek vagy az Ames teszt és Comet esszé [114], [115], [116]. Fontos tehát egy megfelelően érzékeny és specifikus eljárás kidolgozása a szomatikus LINE-1 aktivitást befolyásoló anyagok vizsgálatára. Ezzel pontosabb képet kaphatunk az emberi szervezetet veszélyeztető anyagokról. Felderíthetjük a kemoterápiás kezelések során vagy a mindennapokban használt

anyagok még ismeretlen genomi stabilitásra gyakorolt hatását. Mindezek ismeretében optimalizálhatjuk a rosszindulatú rákos elváltozások gyógyítására használt terápiás eljárásokat és hatékonyabban előzhetjük meg ezen betegségek kialakulását.

8. Következtetések

Kutatásunk célja volt a szomatikus LINE-1 aktivitás vizsgálatához és az eredmények kiértékeléséhez egy optimális immunhisztokémiai esszével detektálható és kvantifikálható mérőrendszer létrehozása. Terveztünk egy másodgenerációs ORFeus riportert, amely lehetővé teszi a LINE-1 retrotranszpozíciós események nyomon követését és vizualizálását immunfestés segítségével. Az új konstrukció működőképességét *in vitro* és *in vivo* modellben egyaránt sikerült igazolni. Az immunhisztokémia alapú eljárás lehetőséget biztosít a szomatikus LINE-1 aktivitást mutató sejtek kvantifikációjára. Ehhez egy mesterséges intelligencia alapú képanalízis eljárást is fejlesztünk. Eredményeink a jövőben felhasználhatóak lesznek a LINE-1 aktivitásra pozitívan ható anyagok kiszűrését célzó toxikológiai eljárás létrehozására. A LINE-1 retrotranszpozíciós események igazolt genotoxikus hatása miatt a LINE-1 aktivitást befolyásoló környezeti hatások, vegyszerek és gyógyszerek potenciális rákkeltő faktorok lehetnek.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Mátés Lajosnak, hogy háttérrel biztosít mindannyiunk munkájához, valamint a munkám során nyújtott segítségéért és hasznos tanácsaiért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Karkas Rékának, akire mindig számíthattam bármilyen problémával fordultam hozzá. Mindig segítőkész és türelmes volt a közös munkánk során.

Hálás vagyok a laboratórium többi tagjának: Dr. Mátés-Nagy Andreának, May Rayanak, Vecsernyés Kittinek, Imre Gergelynek, Kocsis Dominik Sándornak és Verebi Olíviának.

Valamint köszönöm belső konzulensemnek Dr. Huliák Ildikónak, hogy elvállalta képviselőmet az egyetemen.

10. Hivatkozások

1. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al (2001) Erratum: Initial sequencing and analysis of the human genome: International Human Genome Sequencing Consortium (Nature (2001) 409 (860-921)). Nature 412:565–566. <https://doi.org/10.1038/35087627>
2. Horváth V, Merenciano M, González J (2017) Revisiting the Relationship between Transposable Elements and the Eukaryotic Stress Response. Trends Genet 33:832–841. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.08.007>
3. Boeke JD, Garfinkel DJ, Styles CA, Fink GR (1985) Ty elements transpose through an RNA intermediate. Cell 40:491–500. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90197-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90197-7)
4. Protasova MS, Andreeva TV, Rogaev EI (2021) Factors regulating the activity of line1 retrotransposons. Genes (Basel) 12:.. <https://doi.org/10.3390/genes12101562>
5. Moran J V., DeBerardinis RJ, Kazazian HH (1999) Exon shuffling by L1 retrotransposition. Science (80-) 283:1530–1534. <https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1530>
6. Kohlrausch FB, Berteli TS, Wang F, et al (2022) Control of LINE-1 Expression Maintains Genome Integrity in Germline and Early Embryo Development. Reprod Sci 29:328–340. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00461-1>
7. Kemp JR, Longworth MS (2015) Crossing the LINE toward genomic instability: LINE-1 retrotransposition in cancer. Front Chem 3:1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00068>
8. Chen JM, Stenson PD, Cooper DN, Férec C (2005) A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. Hum Genet 117:411–427. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-1321-0>
9. Crow MK (2010) Long interspersed nuclear elements (LINE-1): Potential triggers of systemic autoimmune disease. Autoimmunity 43:7–16. <https://doi.org/10.3109/08916930903374865>
10. Lagisquet J, Zuber K, Gramberg T (2021) Retrotransposons Non-LTR. 1–19
11. Burns KH (2017) Transposable elements in cancer. Nat Rev Cancer 17:415–424. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.35>
12. Rodić N, Sharma R, Sharma R, et al (2014) Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers. Am J Pathol 184:1280–1286. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.01.007>
13. Schrader L, Schmitz J (2019) The impact of transposable elements in adaptive evolution. Mol Ecol 28:1537–1549. <https://doi.org/10.1111/mec.14794>
14. McClINTOCK B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. Proc Natl Acad Sci U S A 36:344–355. <https://doi.org/10.1073/pnas.36.6.344>
15. Baucom RS, Estill JC, Chaparro C, et al (2009) Exceptional diversity, non-random distribution, and rapid evolution of retroelements in the B73 maize genome. PLoS Genet 5:.. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000732>
16. Human I, Sequencing G (2001) 35087627. 412:
17. Kapitonov V V., Jurka J (2001) Rolling-circle transposons in eukaryotes. Proc Natl Acad Sci U S A 98:8714–8719. <https://doi.org/10.1073/pnas.151269298>
18. Zhang Y, Cheng TC, Huang G, et al (2019) Transposon molecular domestication and the evolution of the RAG recombinase. Nature 569:79–84. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1093-7>
19. Broecker F, Moelling K (2019) Evolution of immune systems from viruses and transposable elements. Front Microbiol 10:1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00051>
20. Mustafin RN (2020) Interrelation of Telomeres with Transposable Elements in Aging. Adv Gerontol 10:101–108. <https://doi.org/10.1134/S2079057020020113>
21. Havecker ER, Gao X, Voytas DF (2004) The diversity of LTR retrotransposons. Genome Biol 5:..

<https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-6-225>

22. Garcia-Montojo M, Doucet-O'Hare T, Henderson L, Nath A (2018) Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review. *Crit Rev Microbiol* 44:715–738. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1501345>
23. Mills RE, Bennett EA, Iskow RC, Devine SE (2007) Which transposable elements are active in the human genome? *Trends Genet* 23:183–191. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.006>
24. Cordaux R, Batzer MA (2009) The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 10:691–703. <https://doi.org/10.1038/nrg2640>
25. Deininger P (2011) Alu elements: Know the SINEs. *Genome Biol* 12:1–12. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-12-236>
26. Zhang XO, Pratt H, Weng Z (2021) Investigating the Potential Roles of SINEs in the Human Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 22:199–218. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-111620-100736>
27. Kazazian HH (2004) Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science* (80-) 303:1626–1632. <https://doi.org/10.1126/science.1089670>
28. Piacentini L, Fanti L, Specchia V, et al (2014) Transposons, environmental changes, and heritable induced phenotypic variability. *Chromosoma* 123:345–354. <https://doi.org/10.1007/s00412-014-0464-y>
29. Serrato-Capuchina A, Matute DR (2018) The role of transposable elements in speciation. *Genes (Basel)* 9:. <https://doi.org/10.3390/genes9050254>
30. Seki Y, Okashita N (2013) Epigenetic reprogramming in primordial germ cells in mice. *J Mamm Ova Res* 30:95–100. <https://doi.org/10.1274/jmor.30.95>
31. Peaston AE, Evsikov A V., Graber JH, et al (2004) Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell* 7:597–606. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.09.004>
32. Paço A, Adegá F, Chaves R (2015) LINE-1 retrotransposons: from ‘parasite’ sequences to functional elements. *J Appl Genet* 56:133–145. <https://doi.org/10.1007/s13353-014-0241-x>
33. Moran J V., Holmes SE, Naas TP, et al (1996) High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* 87:917–927. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81998-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81998-4)
34. Feng Q, Moran J V., Kazazian HH, Boeke JD (1996) Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87:905–916. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81997-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81997-2)
35. Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P (2008) Mammalian non-LTR retrotransposons: For better or worse, in sickness and in health. *Genome Res* 18:343–358. <https://doi.org/10.1101/gr.5558208>
36. Cost GJ, Feng Q, Jacquier A, Boeke JD (2002) Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J* 21:5899–5910. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf592>
37. Hohjoh H, Singer MF (1996) Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. *EMBO J* 15:630–639. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00395.x>
38. Xie Y, Mates L, Ivics Z, et al (2013) [art%3A10.1186%2F1759-8753-4-10. 1–10](https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-1)
39. Kubo S, Del Carmen Selemé M, Soifer HS, et al (2006) L1 retrotransposition in nondividing and primary human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8036–8041. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601954103>
40. Horn A V., Celic I, Dong C, et al (2017) A conserved role for the ESCRT membrane budding complex in LINE retrotransposition. *PLoS Genet* 13:. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006837>
41. Freeman BT, Sokolowski M, Roy-Engel AM, et al (2019) Identification of charged amino acids required for nuclear localization of human L1 ORF1 protein. *Mob DNA* 10:1–17. <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0159-2>
42. Doucet AJ, Wilusz JE, Miyoshi T, et al (2015) A 3' Poly(A) Tract Is Required for LINE-1 Retrotransposition. *Mol Cell* 60:728–741. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.012>

43. Miyoshi T, Makino T, Moran J V. (2019) Poly(ADP-Ribose) Polymerase 2 Recruits Replication Protein A to Sites of LINE-1 Integration to Facilitate Retrotransposition. *Mol Cell* 75:1286–1298.e12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.018>
44. Ozata DM, Gainetdinov I, Zoch A, et al (2019) PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat Rev Genet* 20:89–108. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0073-3>
45. Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, et al (2008) A piRNA Pathway Primed by Individual Transposons Is Linked to De Novo DNA Methylation in Mice. *Mol Cell* 31:785–799. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.003>
46. Rodriguez-Terrones D, Torres-Padilla ME (2018) Nimble and Ready to Mingle: Transposon Outbursts of Early Development. *Trends Genet* 34:806–820. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.06.006>
47. Rohrbach S, Siddoway B, Liu CS, Chun J (2018) Genomic mosaicism in the developing and adult brain. *Dev Neurobiol* 78:1026–1048. <https://doi.org/10.1002/dneu.22626>
48. Van Meter M, Kashyap M, Rezazadeh S, et al (2014) SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nat Commun* 5:. <https://doi.org/10.1038/ncomms6011>
49. Vazquez BN, Thackray JK, Simonet NG, et al (2019) SIRT7 mediates L1 elements transcriptional repression and their association with the nuclear lamina. *Nucleic Acids Res* 47:7870–7885. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz519>
50. Montoya-Durango DE, Ramos KA, Bojang P, et al (2016) LINE-1 silencing by retinoblastoma proteins is effected through the nucleosomal and remodeling deacetylase multiprotein complex. *BMC Cancer* 16:1–8. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2068-9>
51. Goodier JL, Zhang L, Vetter MR, Kazazian HH (2007) LINE-1 ORF1 Protein Localizes in Stress Granules with Other RNA-Binding Proteins, Including Components of RNA Interference RNA-Induced Silencing Complex. *Mol Cell Biol* 27:6469–6483. <https://doi.org/10.1128/mcb.00332-07>
52. Idica A, Sevrioukov EA, Zisoulis DG, et al (2017) MicroRNA miR-128 represses LINE-1 (L1) retrotransposition by down-regulating the nuclear import factor TNPO1. *J Biol Chem* 292:20494–20508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.807677>
53. Fung L, Guzman H, Sevrioukov E, et al (2019) MiR-128 restriction of LINE-1 (L1) retrotransposition is dependent on targeting hnRNPA1 mRNA. *Int J Mol Sci* 20:1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms20081955>
54. Zhang X, Zhang R, Yu J (2020) New Understanding of the Relevant Role of LINE-1 Retrotransposition in Human Disease and Immune Modulation. *Front Cell Dev Biol* 8:1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00657>
55. Zhang A, Dong B, Doucet AJ, et al (2014) RNase L restricts the mobility of engineered retrotransposons in cultured human cells. *Nucleic Acids Res* 42:3803–3820. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1308>
56. Zhao K, Du J, Peng Y, et al (2018) LINE1 contributes to autoimmunity through both RIG-I- and MDA5-mediated RNA sensing pathways. *J Autoimmun* 90:105–115. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.02.007>
57. Li P, Du J, Goodier JL, et al (2017) Aicardi-Goutières syndrome protein TREX1 suppresses L1 and maintains genome integrity through exonuclease-independent ORF1p depletion. *Nucleic Acids Res* 45:4619–4631. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx178>
58. Deutschmann J, Gramberg T (2021) SAMHD1 . . . And viral ways around it. *Viruses* 13:1–16. <https://doi.org/10.3390/v13030395>
59. Zhao K, Du J, Han X, et al (2013) Modulation of LINE-1 and Alu/SVA Retrotransposition by Aicardi-Goutières Syndrome-Related SAMHD1. *Cell Rep* 4:1108–1115. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.019>
60. Du J, Peng Y, Wang S, et al (2019) Nucleocytoplasmic shuttling of SAMHD1 is important for LINE-1 suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 510:551–557. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.009>
61. Volkmann B, Wittmann S, Lagisquet J, et al (2020) Human TRIM5 α senses and restricts LINE-1 elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:17965–17976. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922366117>

62. Li X, Zhang J, Jia R, et al (2013) The MOV10 helicase inhibits LINE-1 mobility. *J Biol Chem* 288:21148–21160. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465856>
63. Benítez-Guijarro M, Lopez-Ruiz C, Tarnauskaitė Ž, et al (2018) RNase H2, mutated in Aicardi-Goutières syndrome, promotes LINE-1 retrotransposition. *EMBO J* 37:1–22. <https://doi.org/10.15252/embj.201798506>
64. Warkocki Z, Krawczyk PS, Adamska D, et al (2018) Uridylation by TUT4/7 Restricts Retrotransposition of Human LINE-1s. *Cell* 174:1537-1548.e29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.022>
65. Sampath P, Mazumder B, Seshadri V, et al (2004) Noncanonical Function of Glutamyl-Prolyl-tRNA Synthetase : Gene-Specific Silencing of Translation 9500 Euclid Avenue 2121 Euclid Avenue. 119:195–208
66. Kapasi P, Chaudhuri S, Vyas K, et al (2007) L13a Blocks 48S Assembly: Role of a General Initiation Factor in mRNA-Specific Translational Control. *Mol Cell* 25:113–126. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.028>
67. Orecchini E, Frassinelli L, Galardi S, et al (2018) Post-transcriptional regulation of LINE-1 retrotransposition by AID/APOBEC and ADAR deaminases. *Chromosom Res* 26:45–59. <https://doi.org/10.1007/s10577-018-9572-5>
68. Silvas T V., Schiffer CA (2019) APOBEC3s: DNA-editing human cytidine deaminases. *Protein Sci* 28:1552–1566. <https://doi.org/10.1002/pro.3670>
69. Richardson SR, Narvaiza I, Planegger RA, et al (2014) APOBEC3A deaminates transiently exposed single-strand DNA during LINE-1 retrotransposition. *Elife* 2014:1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.02008>
70. Stenglein MD, Harris RS (2006) APOBEC3B and APOBEC3F inhibit L1 retrotransposition by a DNA deamination-independent mechanism. *J Biol Chem* 281:16837–16841. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602367200>
71. Orecchini E, Doria M, Antonioni A, et al (2017) ADAR1 restricts LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res* 45:155–168. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw834>
72. Macduff DA, Demorest ZL, Harris RS (2009) AID can restrict L1 retrotransposition suggesting a dual role in innate and adaptive immunity. *Nucleic Acids Res* 37:1854–1867. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp030>
73. Orlandi C, Barbon A, Barlati S (2012) Activity regulation of adenosine deaminases acting on RNA (ADARs). *Mol Neurobiol* 45:61–75. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8220-2>
74. Morrish TA, Garcia-Perez JL, Stamato TD, et al (2007) Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres. *Nature* 446:208–212. <https://doi.org/10.1038/nature05560>
75. Servant G, Strevia VA, Derbes RS, et al (2017) The nucleotide excision repair pathway limits L1 retrotransposition. *Genetics* 205:139–153. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.188680>
76. Stracker TH, Roig I, Knobel PA, Marjanović M (2013) The ATM signaling network in development and disease. *Front Genet* 4:1–19. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00037>
77. Coufal NG, Garcia-Perez JL, Peng GE, et al (2011) Ataxia telangiectasia mutated (ATM) modulates long interspersed element-1 (L1) retrotransposition in human neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:20382–20387. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100273108>
78. Watanabe K, Tateishi S, Kawasuji M, et al (2004) Rad18 guides pol η to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. *EMBO J* 23:3886–3896. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600383>
79. Mita P, Sun X, Fenyő D, et al (2020) BRCA1 and S phase DNA repair pathways restrict LINE-1 retrotransposition in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 27:179–191. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0374-z>
80. McKerrow W, Wang X, Mendez-Dorantes C, et al (2022) LINE-1 expression in cancer correlates with p53 mutation, copy number alteration, and S phase checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119:.

<https://doi.org/10.1073/pnas.2115999119>

81. Wylie A, Jones AE, D'Brot A, et al (2016) P53 Genes Function To Restrain Mobile Elements. *Genes Dev* 30:64–77. <https://doi.org/10.1101/gad.266098.115>
82. Kawano K, Doucet AJ, Ueno M, et al (2018) HIV-1 Vpr and p21 restrict LINE-1 mobility. *Nucleic Acids Res* 46:8454–8470. <https://doi.org/10.1093/nar/gky688>
83. Sun X, Wang X, Tang Z, et al (2018) Transcription factor profiling reveals molecular choreography and key regulators of human retrotransposon expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E5526–E5535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722565115>
84. Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabutra T, et al (2013) Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the RUNX3 promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pacific J Cancer Prev* 14:3773–3778. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.6.3773>
85. O'Hagan HM, Wang W, Sen S, et al (2011) Oxidative Damage Targets Complexes Containing DNA Methyltransferases, SIRT1, and Polycomb Members to Promoter CpG Islands. *Cancer Cell* 20:606–619. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.012>
86. Brokowski C AM (2019) 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav* 176:139–148. <https://doi.org/10.1038/ncomms6011.SIRT6>
87. Marques-Rocha JL, Milagro FI, Mansego ML, et al (2016) LINE-1 methylation is positively associated with healthier lifestyle but inversely related to body fat mass in healthy young individuals. *Epigenetics* 11:49–60. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1135286>
88. Morales ME, Servant G, Ade C, Roy-Engel AM (2015) Altering Genomic Integrity: Heavy Metal Exposure Promotes Transposable Element-Mediated Damage. *Biol Trace Elem Res* 166:24–33. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0298-3>
89. Kale SP, Moore L, Deininger PL, Roy-Engel AM (2005) Heavy metals stimulate human LINE-1 retrotransposition. *Int J Environ Res Public Health* 2:14–23. <https://doi.org/10.3390/ijerph2005010014>
90. Kaer K, Speek M (2013) Retroelements in human disease. *Gene* 518:231–241. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.008>
91. Babaian A, Mager DL (2016) Endogenous retroviral promoter exaptation in human cancer. *Mob DNA* 7:1–21. <https://doi.org/10.1186/s13100-016-0080-x>
92. Turker MS (2002) Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene* 21:5388–5393. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205599>
93. Rodriguez-Martin B, Alvarez EG, Baez-Ortega A, et al (2020) Pan-cancer analysis of whole genomes identifies driver rearrangements promoted by LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 52:306–319. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0562-0>
94. Clayton EA, Rishishwar L, Huang TC, et al (2020) An atlas of transposable element-derived alternative splicing in cancer. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 375:. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0342>
95. Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL (2006) The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *J Mol Biol* 357:1383–1393. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.089>
96. Sultana T, van Essen D, Siol O, et al (2019) The Landscape of L1 Retrotransposons in the Human Genome Is Shaped by Pre-insertion Sequence Biases and Post-insertion Selection. *Mol Cell* 74:555–570.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.036>
97. Rodgers K, Mevey M (2016) Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. *J Cell Physiol* 231:15–24. <https://doi.org/10.1002/jcp.25053>
98. Pastor S, Tran O, Jin A, et al (2020) Optical mapping of the 22q11.2DS region reveals complex repeat structures and preferred locations for non-allelic homologous recombination (NAHR). *Sci Rep* 10:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69134-4>
99. Song M, Boissinot S (2007) Selection against LINE-1 retrotransposons results principally from their ability to mediate ectopic recombination. *Gene* 390:206–213. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.09.033>

100. Mazoyer S (2005) Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* 25:415–422. <https://doi.org/10.1002/humu.20169>
101. Mouse Genome Consortium, Brent MR, Birren BW, et al (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520–562
102. Mckerrow W, Kagermazova L, Doudican N, et al (2023) LINE-1 retrotransposon expression in cancerous, epithelial and neuronal cells revealed by 5' single-cell RNA-Seq. *Nucleic Acids Res* 51:2033–2045. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad049>
103. Wagstaff BJ, Barnerßoi M, Roy-Engel AM (2011) Evolutionary conservation of the functional modularity of primate and murine LINE-1 elements. *PLoS One* 6:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019672>
104. Han JS, Boeke JD (2004) A highly active synthetic mammalian retrotransposon. *Nature* 429:314–318. <https://doi.org/10.1038/nature02535>
105. An W, Han JS, Wheelan SJ, et al (2006) Active retrotransposition by a synthetic L1 element in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18662–18667. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605300103>
106. Kobayashi N, Nishikawa M, Hirata K, Takakura Y (2004) Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane: Implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery. *J Gene Med* 6:584–592. <https://doi.org/10.1002/jgm.541>
107. Scott CR (2006) The genetic tyrosinemias. *Am J Med Genet - Semin Med Genet* 142 C:121–126. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30092>
108. Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, et al (1996) Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 12:266–273. <https://doi.org/10.1038/ng0396-266>
109. Limberis MP, Bell CL, Heath J, Wilson JM (2010) Activation of transgene-specific T cells following lentivirus-mediated gene delivery to mouse lung. *Mol Ther* 18:143–150. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.190>
110. Kopasz AG, Pusztai DZ, Karkas R, et al (2022) A versatile transposon-based technology to generate loss- and gain-of-function phenotypes in the mouse liver. *BMC Biol* 20:1–17. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01262-x>
111. Chambers JM, Temple Lang D, Hothorn T, et al Reproducible Research with R and RStudio Second Edition The R Series Aims and Scope Introduction to Scientific Programming and Simulation Using R, Second Edition
112. Orii KE, Orii KO, Souri M, et al (1999) Genes for the human mitochondrial trifunctional protein α - and β - subunits are divergently transcribed from a common promoter region. *J Biol Chem* 274:8077–8084. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.8077>
113. Mátés L, Chuah MKL, Belay E, et al (2009) Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet* 41:753–761. <https://doi.org/10.1038/ng.343>
114. Maron DM, Ames BN (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res Mutagen Relat Subj* 113:173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
115. Cardoso R, Dusinska M, Collins A, et al (2022) In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay: Method Adapted for Genotoxicity Assessment of Nanomaterials. *Front Toxicol* 4:1–5. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.903896>
116. Menz J, Götz ME, Gündel U, et al (2023) Genotoxicity assessment: opportunities, challenges and perspectives for quantitative evaluations of dose–response data. *Arch Toxicol* 97:2303–2328. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03553-w>