

**Egy emlős mesterséges kromoszóma több génnel történő  
feltöltésének új módszere**

*Ph. D. értekezés tézisei*

Tóth Anna

Témavezető: Dr. Katona Róbert  
tudományos főmunkatárs

MTA SZBK Genetikai Intézet

Biológia Doktori Iskola SZTE TTIK

2014.

Szeged

## Bevezetés

A génterápia napjainkban az orvosi gyakorlat viharos gyorsasággal fejlődő, nagy érdeklődéstől övezett, egyben legvitatottabb területe. A génterápia a sejtek molekuláris szintű folyamataiba avatkozik be, genetikai információ bevitelével célirányosan megváltoztatva azokat. A hibás gének cseréje, illetve javítása elvileg mind a szomatikus, mind a csírasejtekben megvalósulhat, de csak a szomatikus sejtek szintjén engedélyezett a folyamat. Az új információ sejtbe történő bevitele hordozók/vektorok segítségével, a vektorok bevitele pedig infekcióval, transzfekciós reagensekkel (pl.: liposzómák, polimerek) vagy fizikai módszerekkel (pl.: elektroporáció) történhet meg. Jelenleg hordozóként leggyakrabban módosított vírusokat használnak (pl.: retrovírus, lentivírus, adenovírus). A génterápia ezekben az esetekben toxikus vagy immunogén is lehet a sejtekre. Az ideális vektor feltételeit (pl.: ne integrálódjon a gazdasejt örökítő anyagába, korlátlan transzgén hordozó kapacitással rendelkezzen) mai ismereteink szerint egyetlen jelenleg alkalmazott génhordozó sem teljesíti.

Új korszakot nyithat azonban az emlős mesterséges kromoszóma, mint lehetséges génterápiás vektor. A vírus-alapú vektorok hiányosságaival szemben az emlős mesterséges kromoszóma szinte korlátlan méretű DNS befogadására képes, valamint nem integrálódik a gazdasejt genomjába. A Platform mesterséges kromoszóma expressziós rendszer (Platform ACE system = Artificial Chromosome Expression system) a szatellit DNS-alapú mesterséges kromoszómákra (SATAC = Satellite DNA-based Artificial Chromosome) épül. A Platform ACE rendszer már feltöltő helyekkel rendelkező kromoszóma. A transzgén(ek) „feltöltése” egy módosított lambda integráz (ACE integráz) segítségével történik, amelynek akceptor helyei (attP) számos kópiában megtalálhatók a mesterséges kromoszómán. Így elvileg lehetséges több transzgén kromoszómára töltése.

A monogénes Krabbe betegség állatmodellben történő sikeres kezelése reménykeltő volt

számunkra, mivel a kombinált emlős mesterséges kromoszóma-öszejt terápiával valósult meg. Ugyanakkor egyre nagyobb az igény a több génhez kötődő – komplex genetikai és daganatos – betegségek kezelésére alkalmas génbeviteli eszköz kifejlesztésére is. Az emlős mesterséges kromoszóma elvileg alkalmas lenne erre a feladatra, de alkalmazását hátráltatja, hogy minden új transzgén kromoszómára töltésekor egy új szelekciós markergént is be kell juttatnunk a sejtekbe azért, hogy a legutoljára bevitt transzgént hordozó sejtvonalat szelektálhassuk. Amellett, hogy véges számú antibiotikum rezisztencia markergén áll rendelkezésre, a nem kívánt expressziókkal is számolni kell, különös tekintettel a várható mellékhatásokra.

### Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, hogy egy olyan ATV (ACE targeting vector) plazmidot állítsunk elő, amely alkalmas arra a feladatra, hogy egymás után több ciklusban is töltsünk az ACE kromoszómára hasznos géneket úgy, hogy csak egy szelekciós markergén kazettát használunk a feltöltések során. Ezt a vektort szupertöltő vektornak, röviden pST-nek neveztük el.

Céljaink eléréséhez a Platform mesterséges kromoszómát hordozó Y29-13D-SFS kínai hörcsög petefészek sejtvonalba két jól nyomon követhető transzgént hordozó plazmid konstrukciót terveztünk a mesterséges kromoszómára tölteni. Az egyik DNS konstrukció az mCherry fehérjét kódoló gént, míg a másik a béta-galaktozidáz enzim génjét (LacZ) hordozza. A transzfekciókat mindkét esetben az ACE integrázt expresszáló plazmiddal együtt kívántuk elvégezni, míg a szupertöltő vektorok stabil jelenlétét a sejtekben G418-szelekcióval szeretnénk bizonyítani. A helyspecifikus integrációt specifikus primerpárokkal történő polimeráz láncreakcióval terveztük ellenőrizni a kiválasztott sejtklónok genomikus DNS-én. Az mCherry gén jelenléte miatt a piros fluoreszcenciát mutató sejtvonalat fluoreszcens mikroszkóp használatával kívántuk vizsgálni. A kiválasztott klónokban a transzgén jelenlétét az intakt mesterséges kromoszómán FISH kísérletekkel szándékoztuk kimutatni. Az első szupertöltő ciklus végén a szelekciós markergén expressziós kazetta sejtekből történő eltávolítását Cre rekombinázt tranziensen expresszáló plazmid konstrukció sejtbe történő transzfekciójával szeretnénk bizonyítani. A szelekciós markergén kazetta hiányát Ganciklovir szelekcióval szándékoztuk bizonyítani. A második szupertöltő ciklusban a fent említett ellenőrzési kísérleteken kívül LacZ festéssel is bizonyítani kívántuk a megfelelő sejtklón kiválasztását.

## **Alkalmazott módszerek**

1. Transzgént hordozó konstrukciók készítése (plazmid DNS tisztítás, restrikciós endonukleáz kezelés, agaróz gélelektroforézis, DNS fragment tisztítás, ligálás, baktérium transzformáció és növesztés szelektív táptalajon, DNS szekvencia tervezés és szoftveres illesztés).
2. Emlőssejtkultúrák fenntartása és transzfekeciója.
3. Genomikus DNS tisztítás a kiválasztott sejtvonalakból.
4. Polimeráz láncreakció.
5. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (metafázisos kromoszóma preparátumok készítése a sejtvonalakból, DNS-DNS hibridizáció, immunjelölés).
6. Fluoreszcens mikroszkópia.
7. Béta-galaktozidáz enzim aktivitásának kimutatása sejtenyészetekben.

## Eredmények és következtetések

A Platform ACE rendszerhez korábban már létrehozták a gének feltöltését biztosító vektorrendszert is. Ez egy „entry” vektorral kezdődik, amely a transzgén befogadására alkalmas multi-klónozó helyet (MCS = Multi-cloning site) tartalmaz. A MCS régió egy olyan expressziós kazetta része, amely egy CMVIE-csirke béta-aktin-béta-globin hibrid (röviden: CX) promótert és SV40polyA szignált is tartalmaz. A teljes expressziós kazettát az I-Ceu és PI-PspI élesztő homing endonukleázok segítségével át lehet vinni a mesterséges kromoszómát targetáló ATV vektorokba, hiszen azok is tartalmazzák az enzimek felismerőhelyeit.

Munkánk során kifejlesztettük a szupertöltő, pST elnevezésű ATV plazmidot, amely többszörös feltöltés esetén is csak egyetlen szelekciós markergén kazettát használ. A pST vektor egy promóter nélküli neomycin antibiotikum rezisztencia gént és egy HSV-TK (Herpes simplex virus thymidine kinase) expressziós kazettát tartalmaz. Az említett régiót két, azonos irányultságú LoxP hely határolja. Kísérleteinkben egy kínai hörcsög ovárium (CHO) sejtvonalban két jól nyomon követhető pST plazmid konstrukciót töltöttünk a mesterséges kromoszómára. Az első szupertöltő plazmid az mCherry gént hordozta. Kromoszómára töltése az ACE integráz által végrehajtott helyspecifikus integráció segítségével történt, amely a mesterséges kromoszómán lévő attP és a szupertöltő vektoron jelenlévő attB felismerőhelyek között jött létre. Az enzim egy módosításnak köszönhetően nemcsak bakteriális környezetben, hanem emlős sejtekben is képes az integrációt katalizálni. Az enzim a pCXLamIntROK plazmidról tranziensen fejeződik ki, mivel a transzfecció során a targetáló vektorral együtt ezt is bejuttatjuk a sejtekbe. A feltöltés következtében a promóter nélküli neomycin rezisztencia gén promótert szerez magának – miután beépült az emlős mesterséges kromoszóma fogadóhelyére –, ami lehetővé teszi a transzgént hordozó sejtvonalak G418 szelekcióval történő kiválasztását. Így olyan sejtvonalat hoztunk létre, amely a mesterséges

kromozómáról expresszáta a piros fluoreszcens fehérjét. A létrehozott sejtvonalakat helyspecifikus integrációt kimutató PCR reakcióval, FISH kísérletekkel és fluoreszcens mikroszkópia segítségével ellenőriztük. Az első szupertöltő ciklus végén a Cre rekombináz tranziens expressziójával eltávolítottuk a neomycin-HSV-TK expressziós kazettát a sejtekből. Ezzel a mesterséges kromoszóma egy következő gén befogadására képes anélkül, hogy egy újabb szelekciós markergént alkalmaznánk. A kromozómára töltés következő lépésében a béta-galaktozidáz enzim génjét, a LacZ-t tartalmazó pST plazmidot töltöttük fel a már mCherry-t expresszáló sejtvonalban a kromozómára. Az ACE integráz segítségével ismét helyspecifikus integrációt hajtottunk végre. Az mCherry és a LacZ gént a mesterséges kromozómán hordozó sejtvonalakat kiválogattuk és a legmegfelelőbb klónt helyspecifikus integrációt kimutató PCR reakcióval, FISH kísérletekkel, fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokkal, illetve LacZ festés segítségével azonosítottuk.

A szupertöltő rendszer használata könnyen kivitelezhetőnek és hatékornak bizonyult, valamint az alkalmazása semmiféle toxikus hatást nem gyakorolt a sejtekre. Ezzel a módszerrel a terápiás alkalmazás előtt lehetővé válhat a szelekciós markergének eltávolítása, lecsökkentve ezzel a lehetséges mellékhatások kockázatát.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Katona Róbertnek**, amiért lehetőséget adott arra, hogy a doktori dolgozatomat csoportjában készíthessem el. Széleskörű szakmai tudásával mindvégig segítette munkámat. Az elmúlt néhány év során bármikor számíthattam rá szakmai kérdésekben.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Hadlaczky Gyulának**, aki nagyban hozzájárult ahhoz, hogy a csoportban dolgozhassak. Mindvégig türelemmel, jobbító kritikával és tanácsokkal segítette a munkámat.

Hálás vagyok **Dr. Cserpán Imrének**, amiért a szakterületem elkészítéséhez szükséges évek alatt megismertette velem a molekuláris biológia alapjait.

Doktori munkámat figyelemmel kísérte és hasznos tanácsokkal segítette **Prof. Dr. Udvardy Andor** is. Köszönöm doktori munkámhoz való lelkiismeretes hozzáállását, türelmét.

Hálával tartozom csoportunk jelenlegi és volt munkatársainak, **Dr. Blaszó Péter Gábornak**, **Dr. Csonka Erikának**, **Dr. Fodor Katalinnak**, **Dr. Praznovszky Tündének** és **Dr. Tubak Vilmosnak**, akikhez bármikor segítségért fordulhattam akár szakmai, akár nem szakmai problémákkal kapcsolatban.

Köszönettel tartozom még a csoportunk többi tagjának, így **Deák Máriának**, **Horváth Csillának**, **Katonáné Székely-Szűcs Kingának**, **Kereső Juditnak**, **Kovács Tímeának**, **Mózesné Holló Gyöngyinek**, **Odrovics Baláznak** és **Rózsavölgyi Mártának**. Segítségük nagyban hozzájárult a kísérletek sikerességéhez.

Megköszönöm az **MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézet** dolgozóinak, hogy szakmai fejlődésemet elősegítő közegben dolgozhattam.

Köszönet illeti **szüleimet**, **testvéreimet** és a **páromat**, hogy bármikor számíthattam a támogatásukra, amely nagyban hozzásegített a munkám elvégzéséhez.



---

## Közlemények

### Folyóirat közlemények:

- Toth, A., Fodor, K., Praznovszky, T., Tubak, V., Udvardy, A., Hadlaczký, Gy., Katona, R. L. Novel method to load multiple genes onto a mammalian artificial chromosome. *Plos One*, 2014 Jan 15;9(1):e85565. doi: 10.1371/journal.pone.0085565. eCollection 2014 Jan 15.
- Tóth, A., Fodor, K., Blazsó, P., Cserpán, I., Praznovszky, T., Tubak, V., Udvardy, A., Hadlaczký, Gy., Katona, R. L. Generation of induced pluripotent stem cells by using a mammalian artificial chromosome expression system. *Acta Biologica Hungarica*, közlésre elfogadva (2014).

### Előadások:

- Új lehetőség a sejt és génterápiában: emlős mesterséges kromoszómával kombinált indukált pluripotens őssejtek. Magyar Humángenetikai Társaság IX. Kongresszusa (Szeged, 2012).
- Indukált pluripotens őssejtek létrehozása egér embrionális kötőszöveti sejtekből. Szegedi Tudományegyetem Sófi József A Szegedi Tehetségekért Alapítvány Ösztöndíj Konferencia (Szeged, 2012).
- A humán akrocentrikus kromoszómák rövid karján lévő szegmentális duplikációk vizsgálata. XXIX. OTDK (Veszprém, 2009).
- Új lehetőség a sejt és génterápiában: emlős mesterséges kromoszómával kombinált indukált pluripotens őssejtek. Szegedi Biológus Doktorandusz Konferencia (Szeged, 2012).
- A possible new recipe for cell and gene therapy: induced pluripotent stem cells combined with artificial chromosomes. STRAUB-NAPOK (Szeged, 2013.05.29.-30.)

*Poszterek:*

- A possible new recipe for cell and gene therapy: induced pluripotent stem cells combined with artificial chromosomes. EMBL Conference Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine (Heidelberg, 2012).
- A possible new recipe for cell and gene therapy: induced pluripotent stem cells combined with artificial chromosomes. STRAUB-napok (Szeged, 2010).
- A possible new recipe for cell and gene therapy: induced pluripotent stem cells combined with artificial chromosomes. Hungarian Molecular Life Sciences (Siófok, 2013).

---

## Társszerzői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Fodor Katalin, Dr. Blaszó Péter, Dr. Cserpán Imre, Dr. Praznovszky Tünde, Dr. Tubak Vilmos, Prof. Dr. Udvardy Andor, Prof. Dr. Hadlaczky Gyula, Dr. Katona Róbert** hozzájárulok, hogy **Tóth Anna** felhasználja *Tóth, A. et al. Generation of induced pluripotent stem cells by using a mammalian artificial chromosome expression system (2014)* közleményünkben foglalt eredményeinket a Szegedi Tudományegyetem TTIK Biológia Doktori Iskola keretében a PhD fokozat eléréséért benyújtott dolgozatában, és egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos fokozat megszerzésekor, és ezt a jövőben sem teszem.

Szeged, 2014. február 21.

.....

Dr. Fodor Katalin

.....

Prof. Dr. Udvardy Andor

.....

Dr. Praznovszky Tünde

.....

Dr. Katona Róbert

.....

Dr. Tubak Vilmos

.....

Tóth Anna

.....

Dr. Blaszó Péter

### Társszerzői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Fodor Katalin, Dr. Praznovszky Tünde, Dr. Tubak Vilmos, Prof. Dr. Udvardy Andor, Prof. Dr. Hadlaczky Gyula, Dr. Katona Róbert** hozzájárulok, hogy **Tóth Anna** felhasználja *Tóth, A. et al. Novel method to load multiple genes onto a mammalian artificial chromosome (2014)* közleményünkben foglalt eredményeinket a Szegedi Tudományegyetem TTIK Biológia Doktori Iskola keretében a PhD fokozat eléréséért benyújtott dolgozatában, és egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos fokozat megszerzésekor, és ezt a jövőben sem teszem.

Szeged, 2014. február 21.

.....

Dr. Fodor Katalin

.....

Prof. Dr. Udvardy Andor

.....

Dr. Praznovszky Tünde

.....

Dr. Katona Róbert

.....

Dr. Tubak Vilmos

.....

Tóth Anna