

DNA 转座子异源活性的大规模调查揭示其功能多样性并扩展基因工程工具箱

张童童, 谭生军, 唐娜, 李源清, 王皓毅, 张勇

中国科学院动物研究所, 北京 100101

自 1948 年美国科学家 Barbara McClintock 首次报道转座子以来^[1], 这类跳跃遗传元件对宿主演化的重要意义逐渐被揭示^[2–5]。其中, DNA 转座子作为主要类型之一, 长期以来备受关注。然而, 由于以往多为个案研究, DNA 转座子活性的决定因素与进化模式的一般规律尚不清晰。尽管 DNA 转座子可作为基因工程工具用于插入诱变或转基因载体^[6,7], 但目前只有 *Sleeping Beauty* (SB) 等少数几种转座子得到了开发和广泛应用。因此, 系统挖掘具有不同功能特点的转座子工具的工作亟待开展^[8]。

2024 年 6 月 5 日, 中国科学院动物研究所张勇和王皓毅研究组在 *Cell* 杂志上在线发表了题为“Heterologous survey of 130 DNA transposons in human cells highlights their functional divergence and expands the genome engineering toolbox”的研究论文^[9]。该研究结合进化分析与实验筛选, 从 102 个动物基因组中发现了 40 个在人源细胞中具有转座活性的新型 DNA 转座子, 同时系统解析了 DNA 转座子的活性相关因素和进化动态(图 1)。这些具有不同功能特点的转座子拓展了相关基因工程工具箱, 实验表明高转座活性的 *Mariner2_AG* (MAG) 转座子在 CAR-T 细胞治疗实验中展现出更强的肿瘤清除能

力, 具有临床应用价值。

研究者首先建立了 DNA 转座子异源活性的数据集。此前, 共有 20 个 DNA 转座子在哺乳动物细胞中具有转座活性; 除了来自植物的 *Ac* 转座子外, 其他 19 个 DNA 转座元件都来自后生动物, 其中 6 个来自于鱼类。因此, 该研究基于 102 个无脊椎和脊椎动物基因组建立了活跃转座子的分析流程, 其中包括 100 个 UCSC 基因组浏览器注释的后生动物基因组和两个未注释的鱼类基因组。通过限定转座子的进化特性和完整转座结构, 该研究共预测了 130 个潜在活跃的 DNA 转座子; 人源细胞中的高通量筛选实验进一步验证了 40 个转座子具有异源转座活性。其中, 来自蚊子的 MAG、来自洞穴鱼的 *Tc1-2_St* 等转座子活性超越了经过大量优化的 SB100X。这一结果将哺乳动物中活跃转座子载体的数量从 20 提升至 60, 大幅拓展了其进化多样性。

通过比较活跃与不活跃的转座子, 研究者发现高活性 DNA 转座子富集在 *Tc1/mariner* 超家族; 这与该超家族转座子频繁发生水平基因转移的特点相吻合。在转座子的来源物种、家族、年龄和完整拷贝数这四个与转座活性相关的进化特征中, 拷贝数最能准确预测其在人类细胞中的活性有无。另一方

收稿日期: 2024-06-05; 网络发布日期: 2024-06-06

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 32325014), 农业生物育种重大专项(编号: 2023ZD0407401), 国家重点研发计划(编号: 2019YFA0802600, 2019YFA0110000), 中国科学院基础前沿科学研究计划(编号: ZDBS-LY-SM005)和中国科学院战略性先导专项(编号: XDA16010503)项目资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32325014), the Biological Breeding-Major Projects (No. 2023ZD0407401), the National Key R&D Program of China (Nos. 2019YFA0802600, 2019YFA0110000), the Basic Frontier Science Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. ZDBS-LY-SM005), and the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. XDA16010503)]

作者简介: 张童童, 博士研究生, 专业方向: 再生医学。E-mail: zhangtongtong@ioz.ac.cn

通讯作者: 王皓毅, 博士, 研究员, 研究方向: 基因工程技术, 细胞治疗技术的开发和应用。E-mail: wanghaoyi@ioz.ac.cn

张勇, 博士, 研究员, 研究方向: 进化基因组学。E-mail: zhangyong@ioz.ac.cn

DOI: 10.16288/j.yczz.24-161

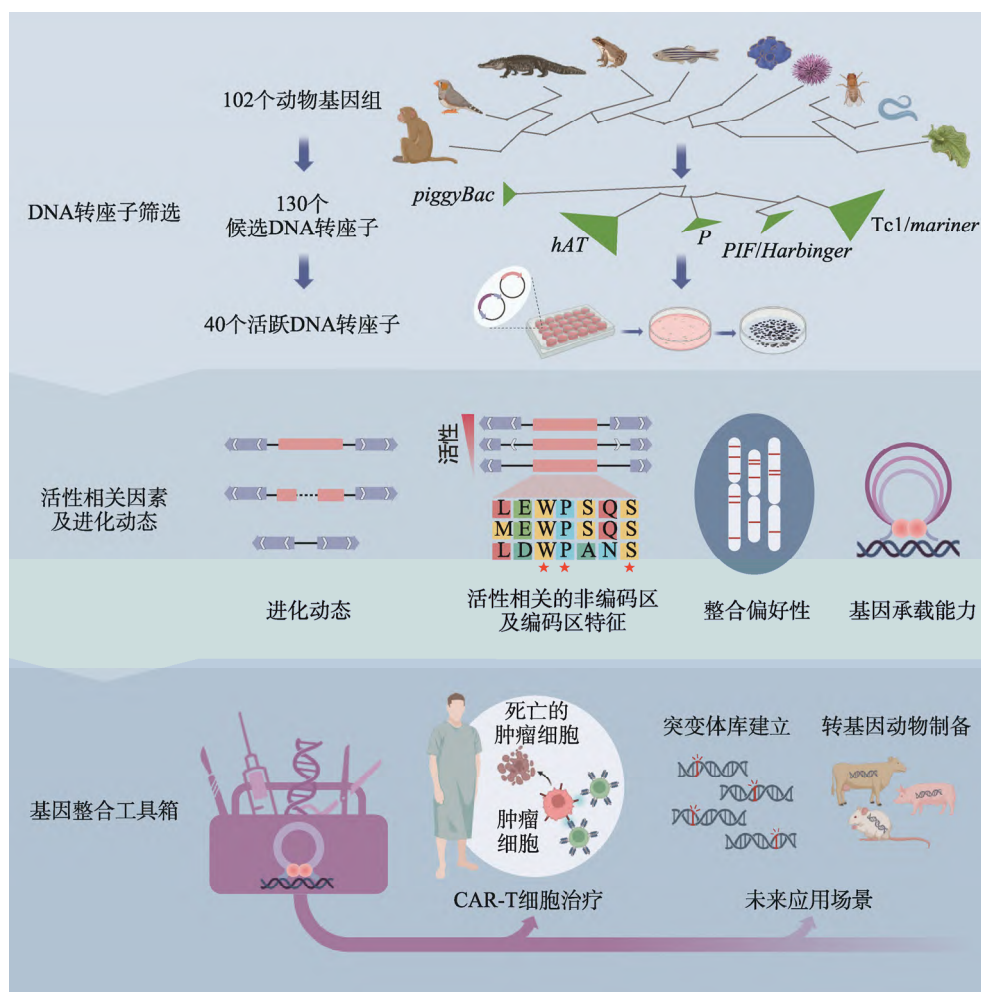


图 1 活跃 DNA 转座子挖掘、解析及应用的全流程

Fig. 1 The process of screening, analyzing, and applying active DNA TEs

根据参考文献[9]修改绘制。

面, 该研究探究了影响转座活性的序列特点。在 *Tc1/mariner* 超家族中, 转座子末端的反向重复 (terminal inverted repeat, TIR) 如果相对较长并其内部包含正向重复 (directed repeat, DR), 那么该转座子更有可能有活性, 且其活性也较高。除了非编码区特征外, 该研究在转座酶编码区证实了 *Tc1* 家族和 *hAT* 超家族中影响转座活性的已知功能性位点的绝对保守性^[10,11], 同时还报道了更多新的功能氨基酸位点。

考虑到 DNA 转座子作为基因工程工具的潜在可能, 该研究进一步探究了新型转座子的整合偏好和基因承载能力等功能属性。结果表明, 来源于不同超家族的高活性转座子展示出三种整合偏好模式:

一是接近于随机的整合模式, 如 *Tc1* 家族成员; 二是偏好于异染色质区域, 如 *piggyBac-1_AMi* 转座子; 三是偏好于转录活跃区域, 如 *hAT* 超家族成员。这些 DNA 转座子的整合偏好性差异代表了其在不同领域的应用潜力, 例如第三种转座子可用于增强子或基因定位分析。基因承载能力分析则显示出活性最高的 MAG 转座子在该方面的明显优势: 其在承载 10 kb 的外源基因时仍可表现出高达 30% 的转座效率。

最后, 该研究初步评估了 MAG 转座子在 CAR-T 细胞治疗的应用潜力, 揭示了其作为基因治疗载体的优越性。相比于常用的慢病毒和 SB100X 载体 (特别是前者), MAG 转座子制备的 CAR-T 细胞在人

Burkitt's 淋巴瘤细胞系 Raji 构建的恶性血液瘤模型和人肺鳞癌细胞系 NCI-H226 构建的实体瘤模型中均展现了更佳的治疗效果, 相应治疗组的血液瘤模型小鼠拥有更高的存活率和更长的存活时间, 而相应治疗组的实体瘤模型小鼠也具有更好的肿瘤清除效率。

综上所述, 该研究基于自然界的动物遗传多样性开展了迄今为止最大规模的 DNA 转座子活性筛选, 从而获得了目前最大的活跃 DNA 转座子数据集。这不仅揭示了与转座活性相关的进化因素和功能特征, 还扩展了基于 DNA 转座子的基因工程工具箱。

参考文献(References):

- [1] McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1950, 36(6): 344–355.
- [2] Almeida MV, Vernaz G, Putman AL, Miska EA. Taming transposable elements in vertebrates: from epigenetic silencing to domestication. *Trends Genet*, 2022, 38(6): 529–553.
- [3] Moon S, Cassani M, Lin YA, Wang L, Dou K, Zhang ZZ. A robust transposon-endogenizing response from germline stem cells. *Dev Cell*, 2018, 47(5): 660–671. e663.
- [4] Wells JN, Feschotte C. A field guide to eukaryotic transposable elements. *Annu Rev Genet*, 2020, 54: 539–561.
- [5] Lohe AR, Moriyama EN, Lidholm DA, Hartl DL. Horizontal transmission, vertical inactivation, and stochastic loss of mariner-like transposable elements. *Mol Biol Evol*, 1995, 12(1): 62–72.
- [6] Rubin GM, Spradling AC. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 1982, 218(4570): 348–353.
- [7] Zhao D, Ferguson A, Jiang N. Transposition of a rice Mutator-like element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell*, 2015, 27(1): 132–148.
- [8] Kebriaei P, Izsvák Z, Narayanavari SA, Singh H, Ivics Z. Gene therapy with the sleeping beauty transposon system. *Trends Genet*, 2017, 33(11): 852–870.
- [9] Zhang TT, Tan SJ, Tang N, Li YQ, Zhang CZ, Sun J, Guo YY, Gao H, Cai YJ, Sun W, Wang CX, Fu LZ, Ma HJ, Wu YC, Hu XX, Zhang XC, Peter G, Yan WH, Zhao YH, Chen Q, Guo BC, Wang HY, Zhang EY. Heterologous survey of 130 DNA transposons in human cells highlights their functional divergence and expands the genome engineering toolbox. *Cell*, 2024, doi: 10.1016/j.cell.2024.05.007.
- [10] Plasterk RH, Izsvák Z, Ivics Z. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends Genet*, 1999, 15(8): 326–332.
- [11] Yuan YW, Wessler SR. The catalytic domain of all eukaryotic cut-and-paste transposase superfamilies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(19): 7884–7889.