

Transzgénikus modellállatok: genomikai megközelítések



Vellai Tibor

(vellai@falco.elte.hu)



**Eötvös Loránd Tudományegyetem
Genetikai Tanszék**



2019.11.07

GENETIKA



A mai biológiai kutatások integráló diszciplínája (a legutóbbi 10 orvosbiológiai Nobel díj közül 6-ot genetikai kutatásokért ítelték oda).

Alapvető célja:

- **az öröklődés törvényszerűségeinek feltárása**
- **gének és géntermékek biológiai funkciójának meghatározása**

Eszköztára:

- **funkció elrontása - mutagenézis**
- **szerkezet (információ) meghatározása - szekvenálás**



**Orvosi Nobel díj, 2002
Sydney Brenner**

„I almost forgot to say that genetics will disappear as a separate science because, in the 21st century, everything in biology will become gene-based, and every biologist will be a geneticist.”

Sydney Brenner

Funkcionális megközelítés: gének funkciójának megváltoztatása (elrontása vagy hiperaktiválása) – genetikai boncolás

I. mutáns analízis (*forward* és *reverse genetics*)

- gene knock out* (génkiütés – deléciók)
- transzpozonok
- fenotípusos elemzés (*mutant screens*)

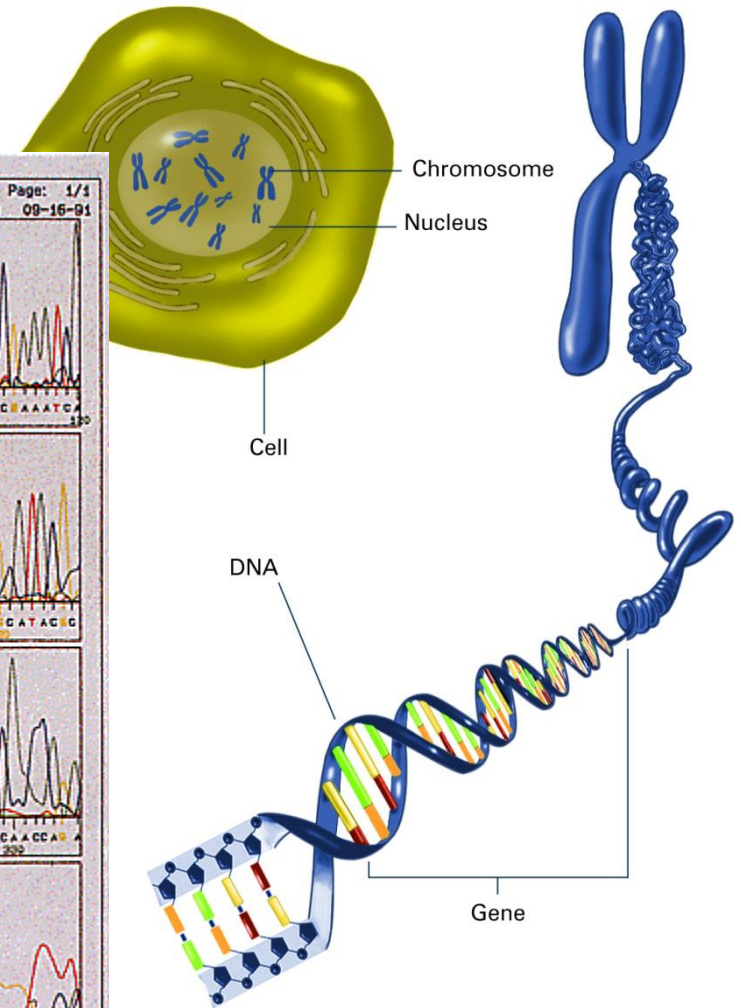
II. RNS interferencia - géncsendesítés (*reverse genetics*) (*gene knock down*)

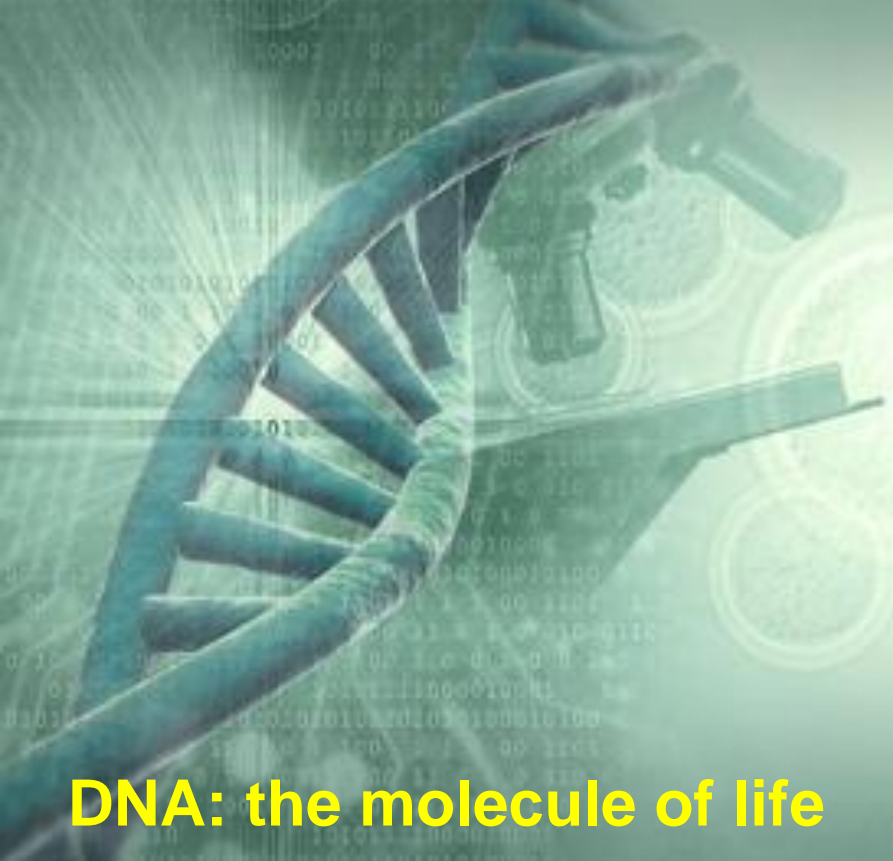
Klasszikus (*forward*) genetika: mutáns fenotípus  gén

Fordított (*reverse*) genetika: gén  biológiai funkció (fenotípus)

feltétele: genomi szekvenciák ismerete

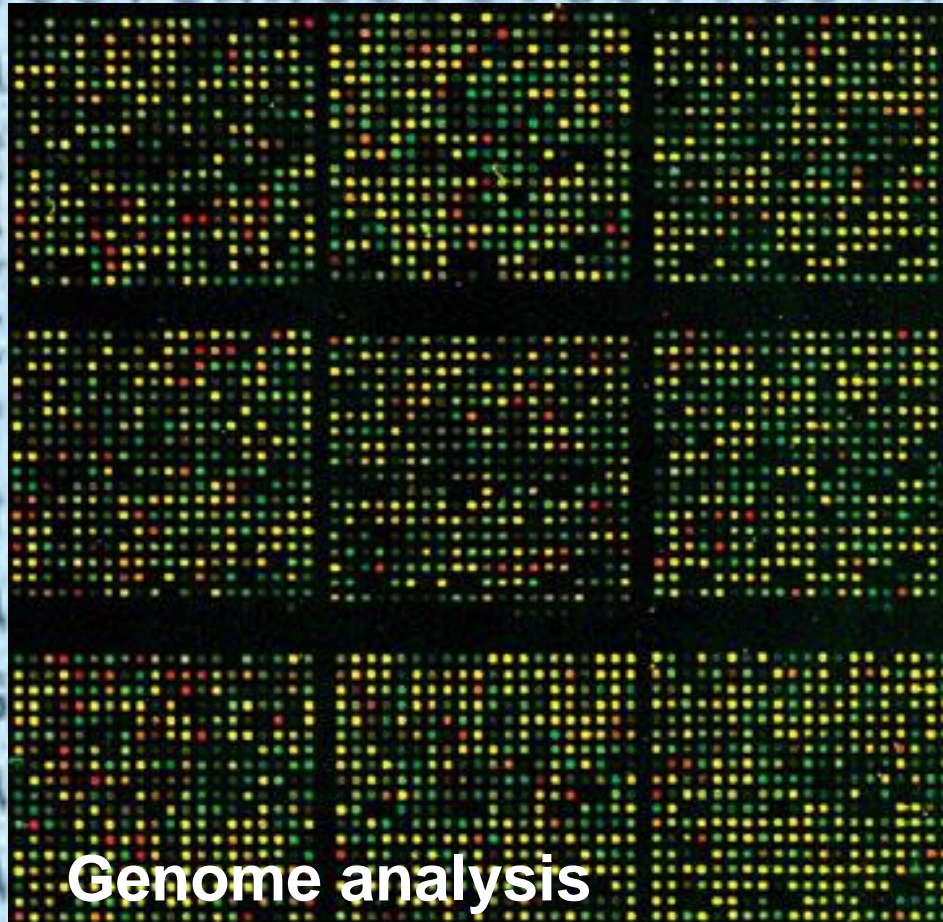
A reverse genetikai világ alapja – genomika (teljes genom szekvenciák ismerete)





DNA: the molecule of life

TCAGTGAACCTTCGCAGTCTGA
AAACTTTCAACAACGGATCTC
AGAACGCAGCGAAATGCGATA
TTCAGTGAATCATCGAATCTT
TTGGTATTCCGAGGGGGCATGC
ACCCTCAAGCTCTGCTTGGTA

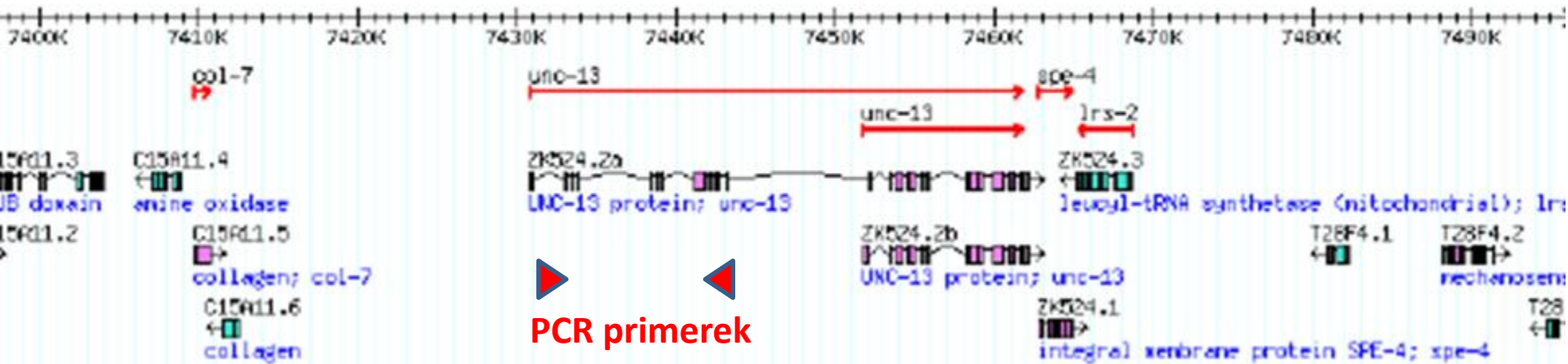


Genome analysis

AAGGTAAGAAAGTTTTTCTC
CTGGGTGCTGGGTGCTGGGT
TTGCCATTATCGCTTCGGTGA
TTGGCCCGCGCTAAGCCTCG
CGCATCTGGTTTTTTTTCGA
ACCCTCGCCAGACACGCCA

Reverse genetika

wormbase



PCR primerek

A,

Duplaszálú RNS (géncsendesítés)

B,

Random mutagenesis, deléciók allél izolálása
PCR-alapú (a kisebb fragment preferáltan amplifikálódik)

Mutánsok elemzése a mutagenézis korszaka előtt – Morgan iskola

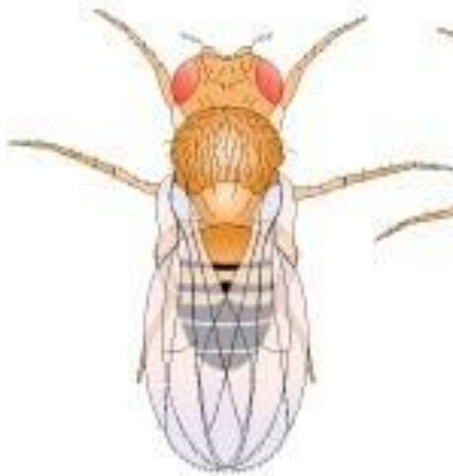
Spontán mutánsok izolálása fáradságos munkával Morgan csoportjában.



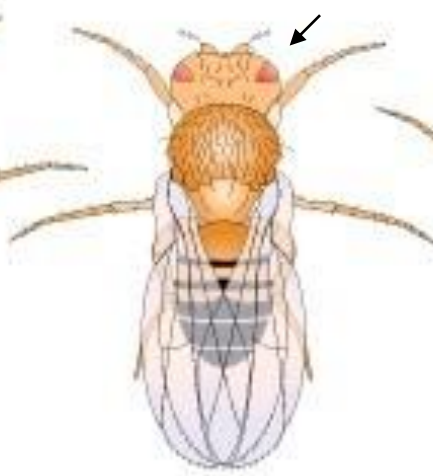
Thomas Hunt Morgan
Orvosi Nobel díj, 1933



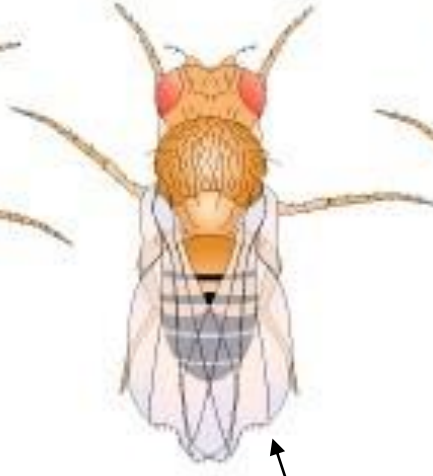
Drosophila morfológiai mutánsok



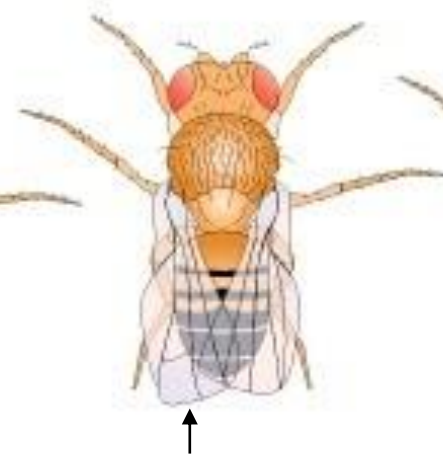
Vad típus



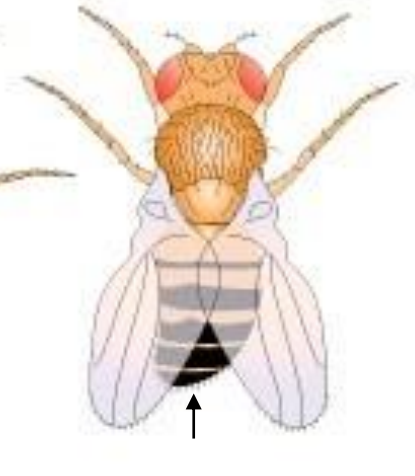
Bar eyes



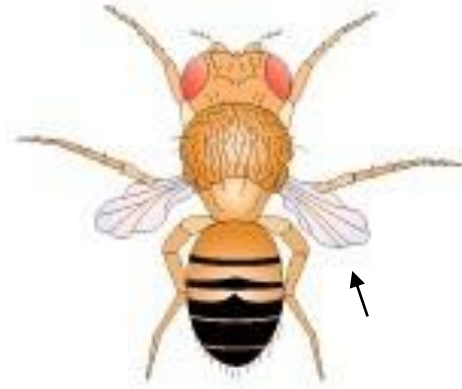
Cut wings



Rudimentary wings



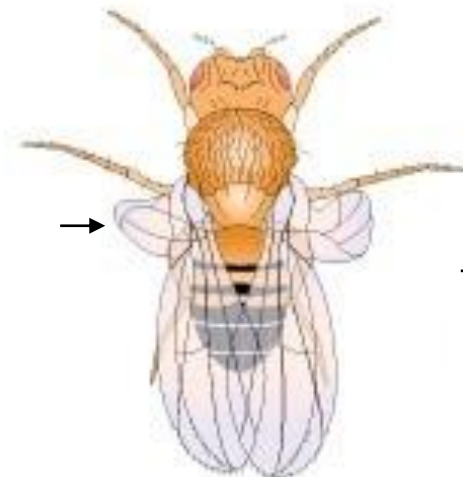
Rotated abdomen



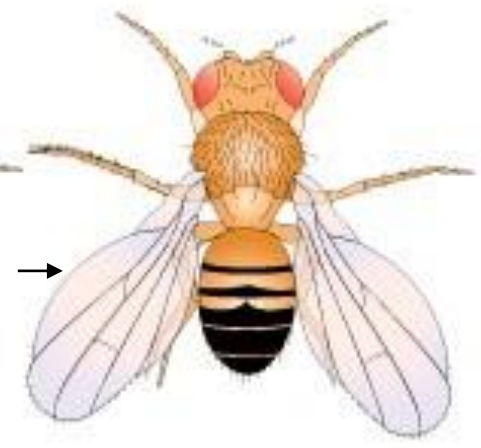
Vestigial wings



Curly wings



Bithorax



Dichaete

Mutációk indukálása: Hermann Muller, a mutagenézis atyja

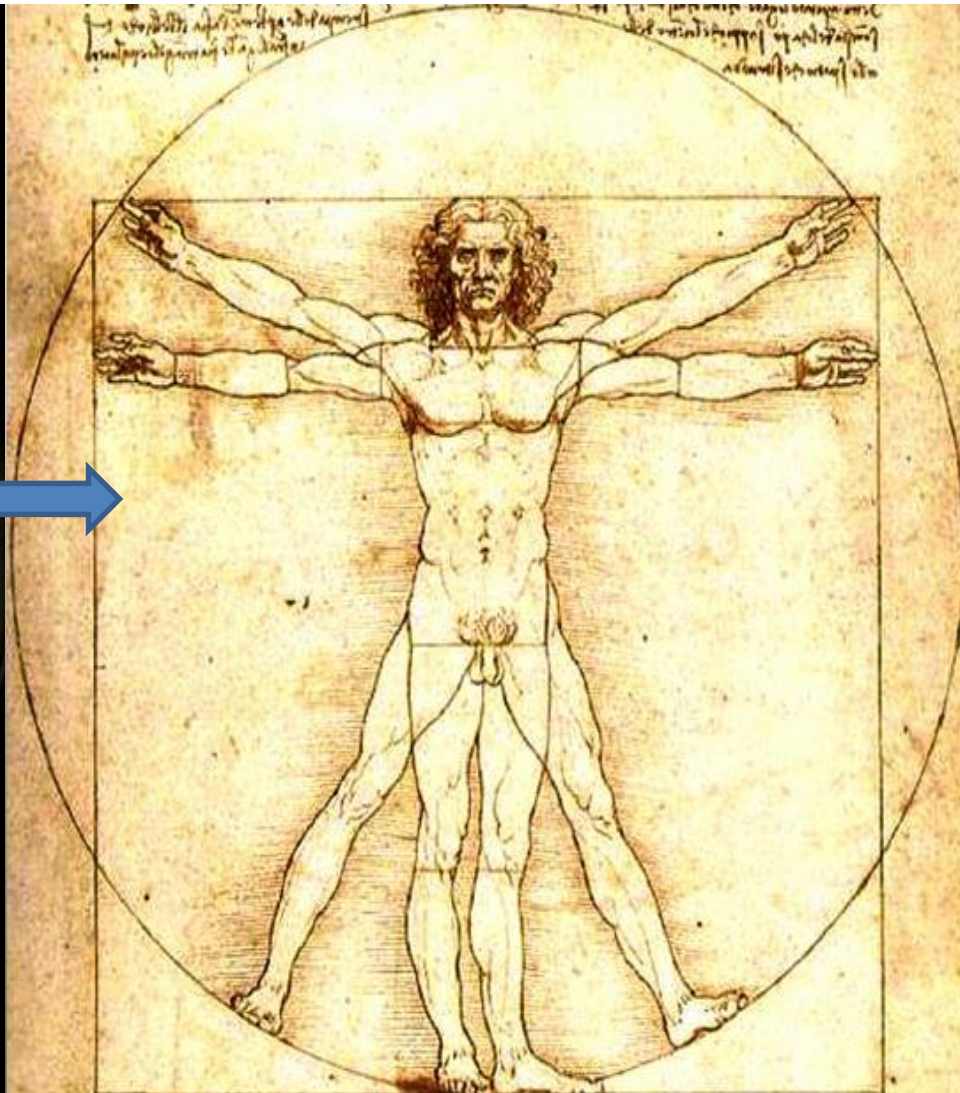
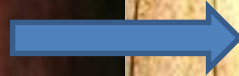


- mutagenézis
- a gén genetikai természetete
- *Muller's morphs:*
 - Amorph* (null)
 - Hypomorph* (redukált)
 - Hypermorph* (túlaktivált)
 - Antimorph* (domináns-neg)
 - Neomorph* (új funkció)

Hermann J. Muller
Orvosi Nobel díj, 1946

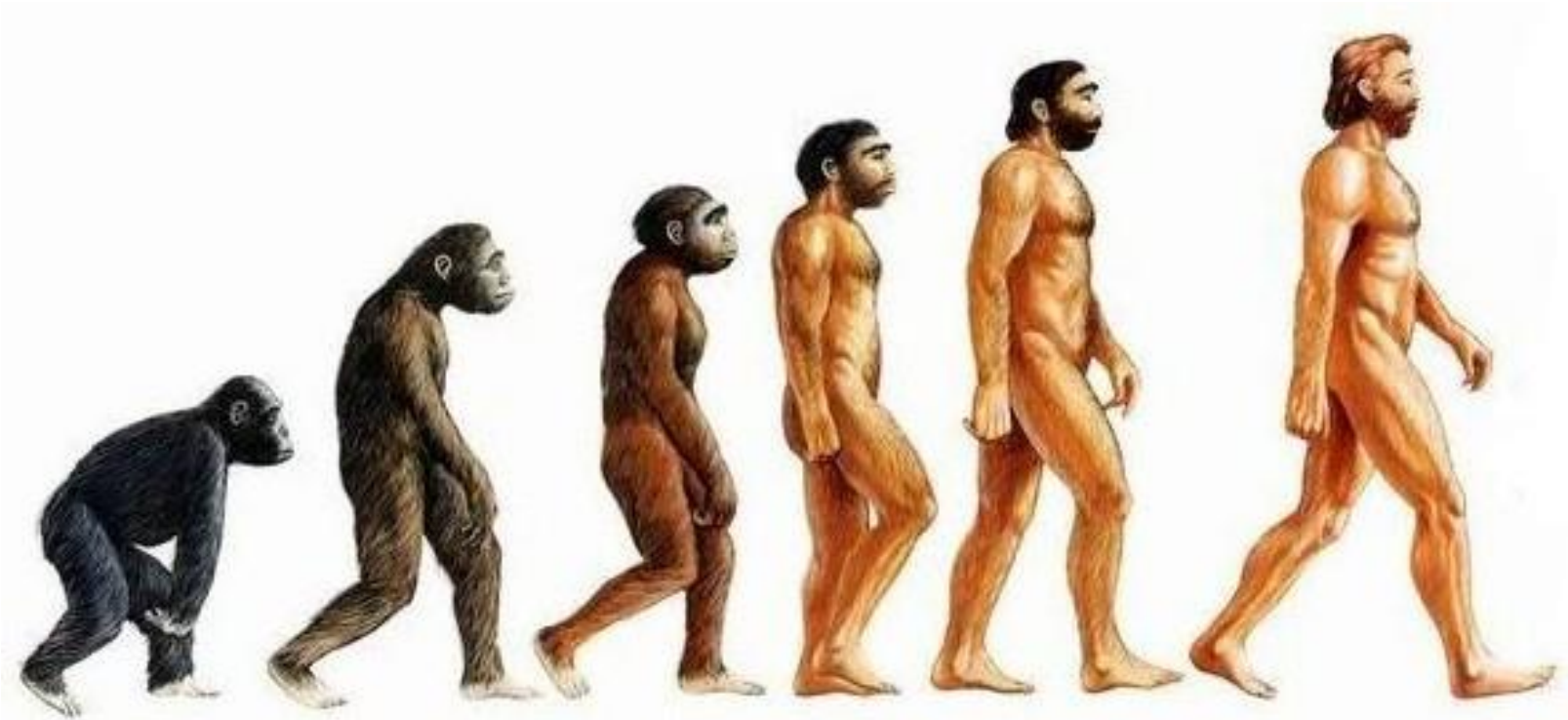
A mutagenézis célja: génjeink funkciójának megismerése

Egyedfejlődésünk feltérképezése.



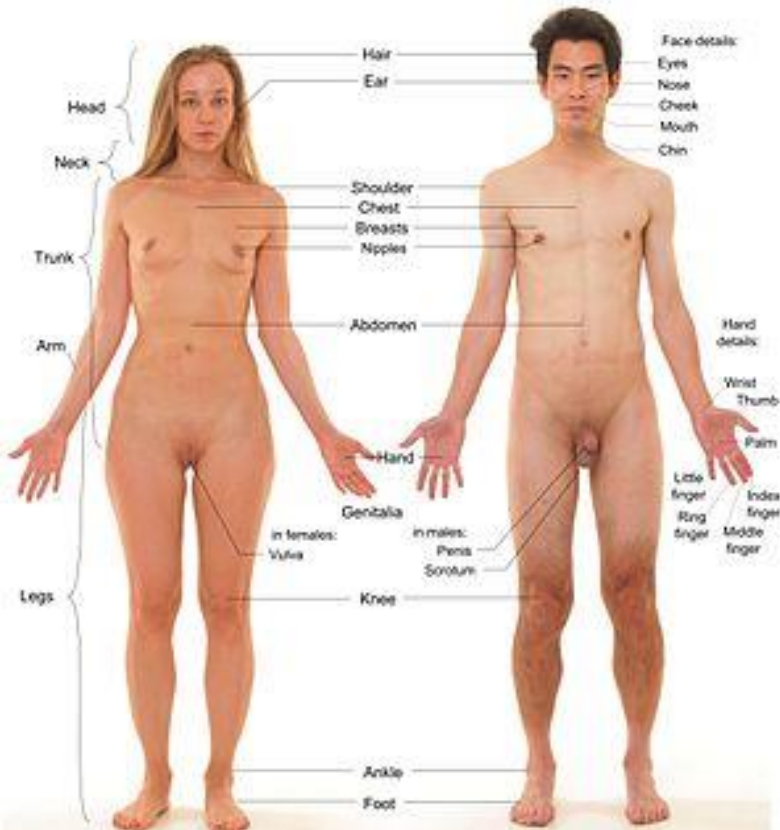
A mutagenézis célja: génjeink funkciójának megismerése

Honnan jövünk ...



... és merre tartunk?

Az ember, mint genetikai modell rendszer?



Nem:

- hosszú generációs idő
- kicsi egyedszám (egy keresztezésből)
- nem mutagenizálható
- nem keresztezhető szabadon
- ...

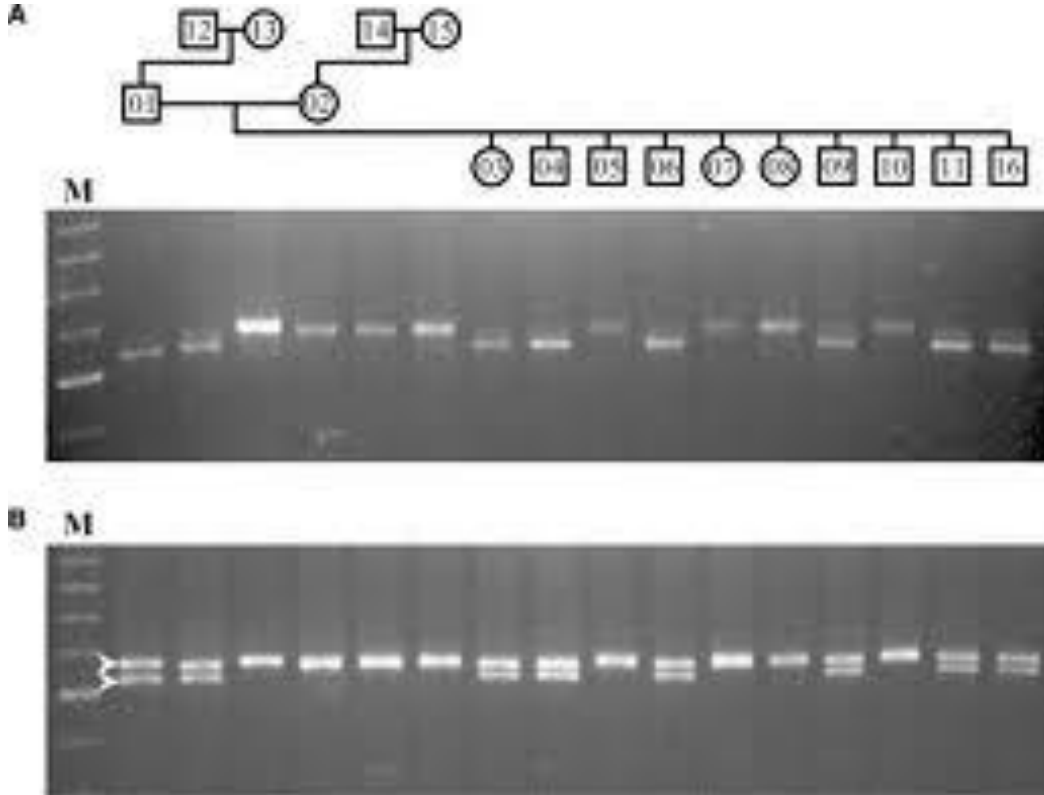
Valójában igen:

- szekvenálási hatékonyság
- természetes mutagenézis (betegségek)
- mutáns bankok (kórházakban)
- családfák (CEPH családok, LOD analízis)

CEPH családok

*(Centre d'Étude du Polymorphisme Humain (CEPH) -
Foundation Jean Dausset-CEPH)*

(Center for the Study of Human [Polymorphisms](#))



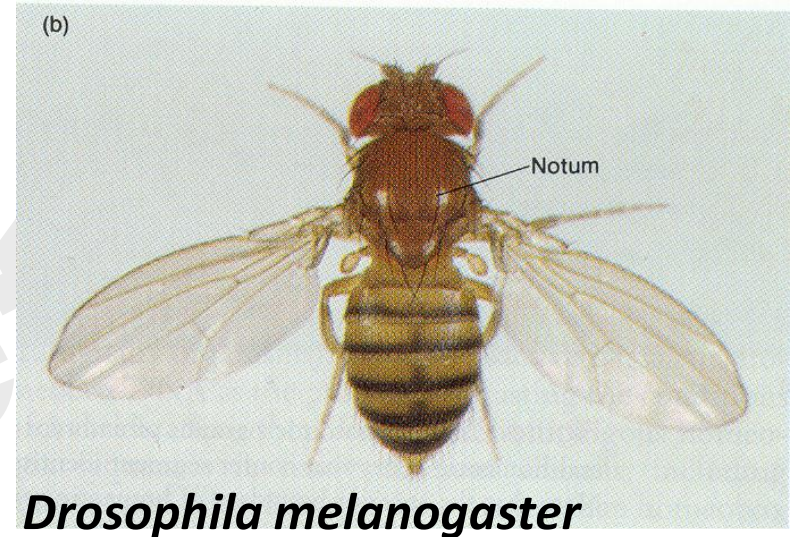
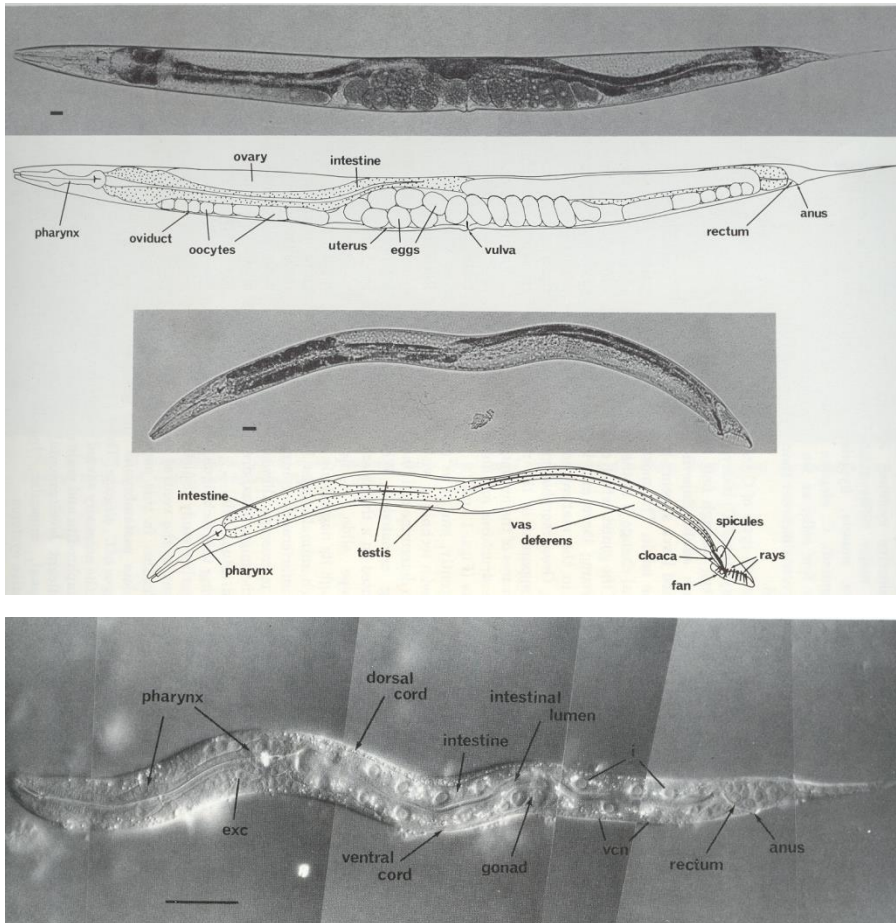
Létrehoztak egy térképet, amely a humán kromoszómák genetikai markereit tartalmazza immortalizált sejt kultúrák alapján.

Megoldás: genetikai modellszervezetek

- Bakétriумok (1996-tól)
- Élesztő (egysejtű)
- *Caenorhabditis elegans* (fonalféreg)
- *Drosophila melanogaster* (rovar)
- *Danio rerio* (hal)
- *Mus musculus* (emlős)
- *Arabidopsis thaliana* (növény)

Génfunkciók és az egyedfejlődés alapvető kérdéseinek tanulmányozása genetikai modell szervezeteken

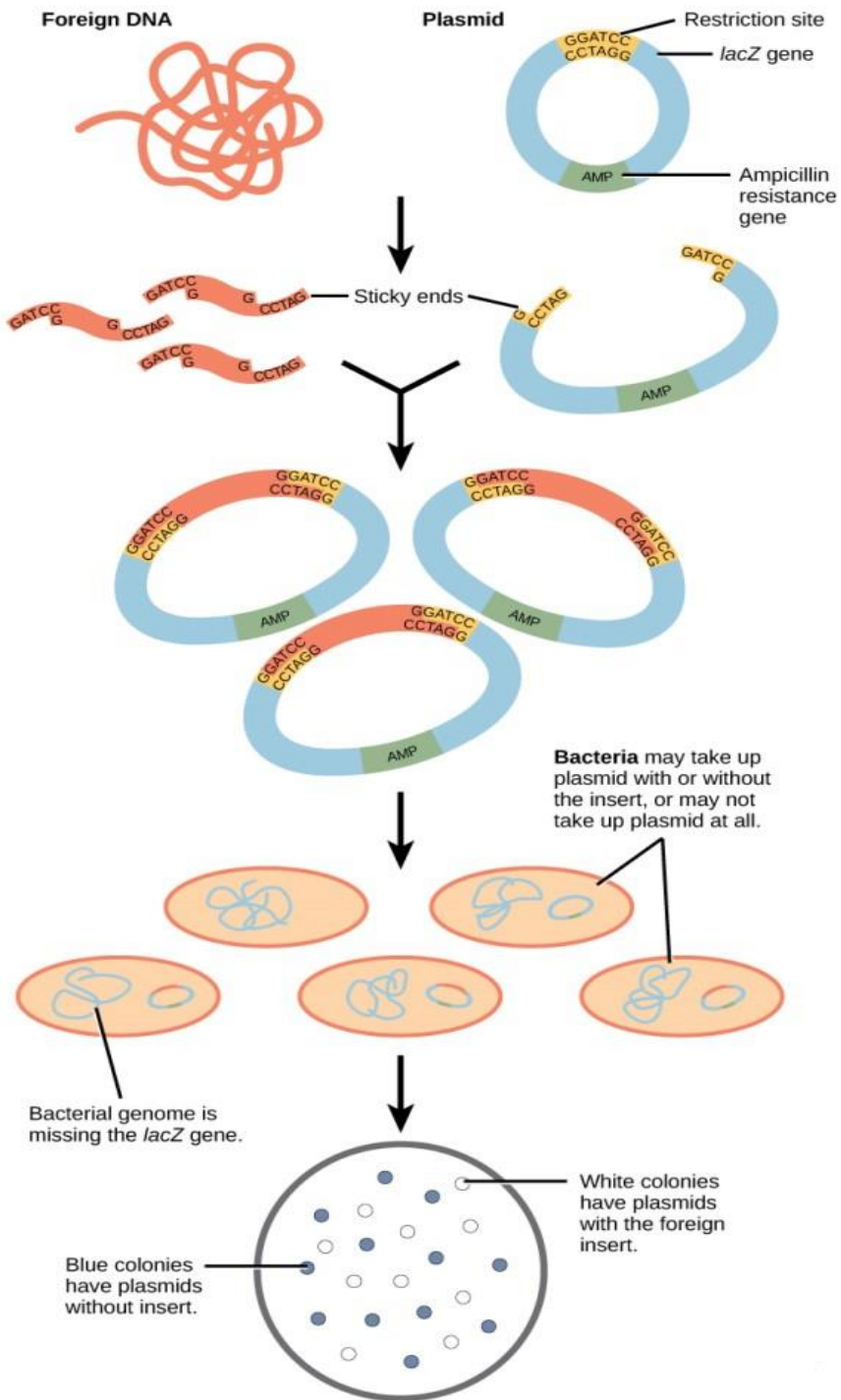
Caenorhabditis elegans



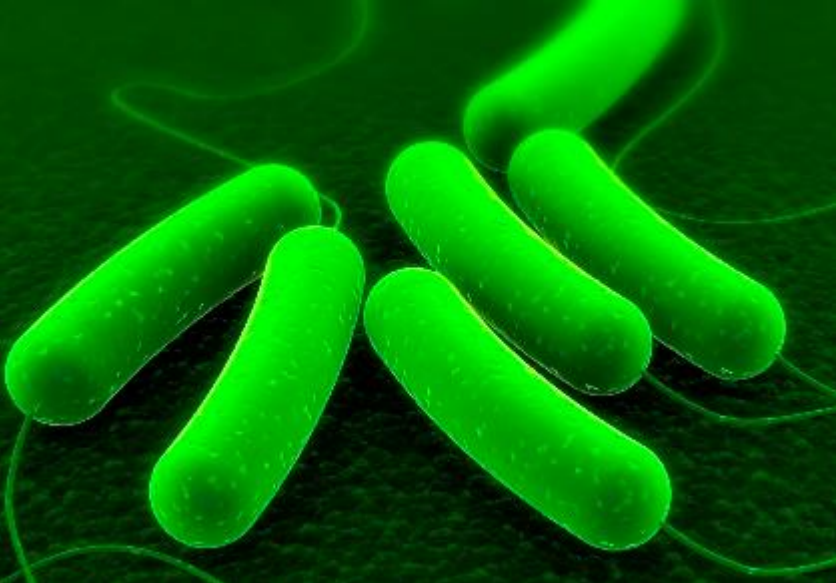
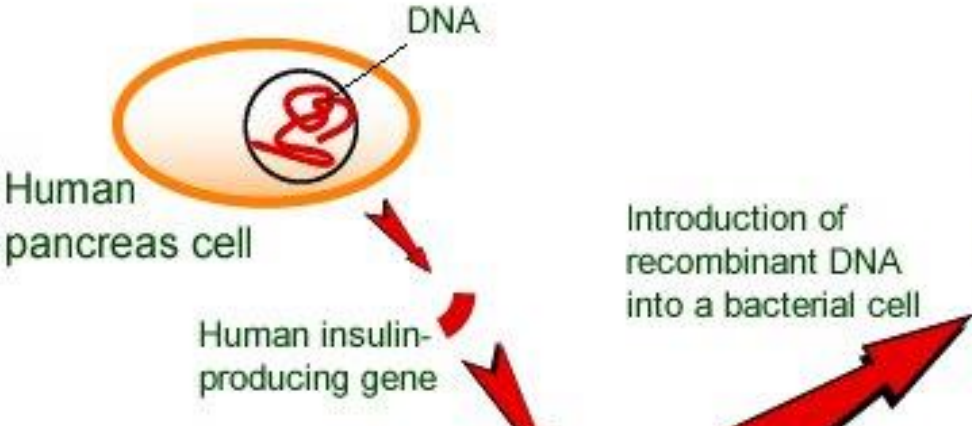
... és természetesen

Arabidopsis thaliana





Human Insulin Production



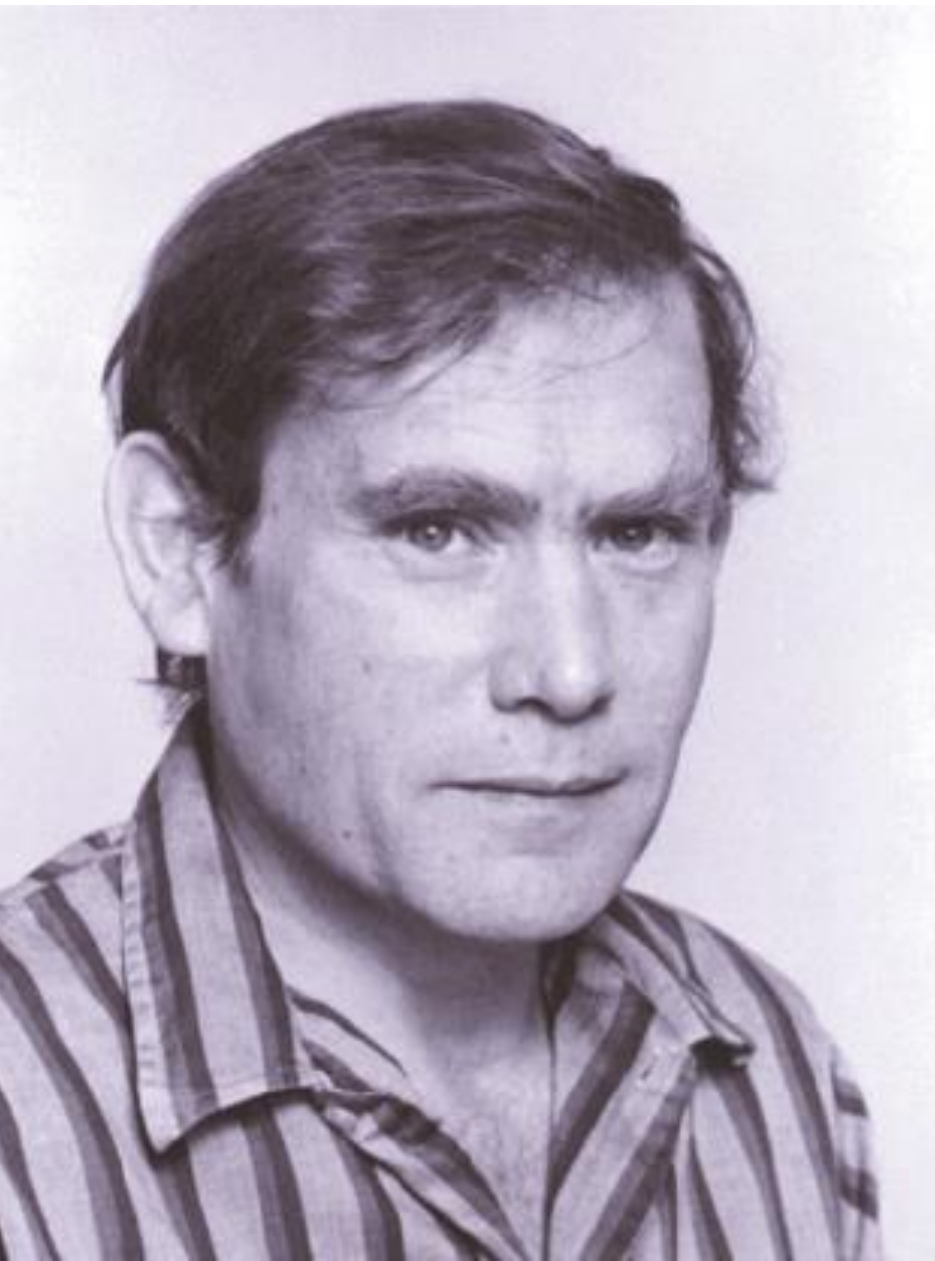
Extraction &



A fonalféreg *Caenorhabditis elegans*



A *C. elegans* kutatások kezdete...



Sydney Brenner
(1963)

“I would like to tame
a small metazoan...”

Frontvonalak:

- idegrendszer működése
- egyedfejlődés szabályozása

Brenner levele a Nobel-díjas Max Perutz-hoz, az MRC igazgatójához

Brenner's letter to Max Perutz
(1963)



Max Perutz

"Dear Max,

It is now widely realized that nearly all the "classical" problems of molecular biology have either been solved or will be solved in the next decade. The entry of large numbers of American biochemists into the field will ensure that all the chemical details of replication and transcription will be elucidated. Because of this, I have long felt that the future of molecular biology lies in the extension of research to other fields of biology, notably development and the nervous system."

....

-Sydney Brenner

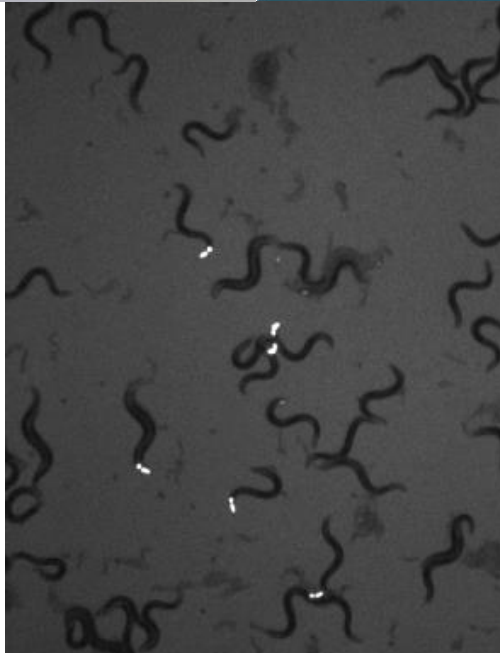
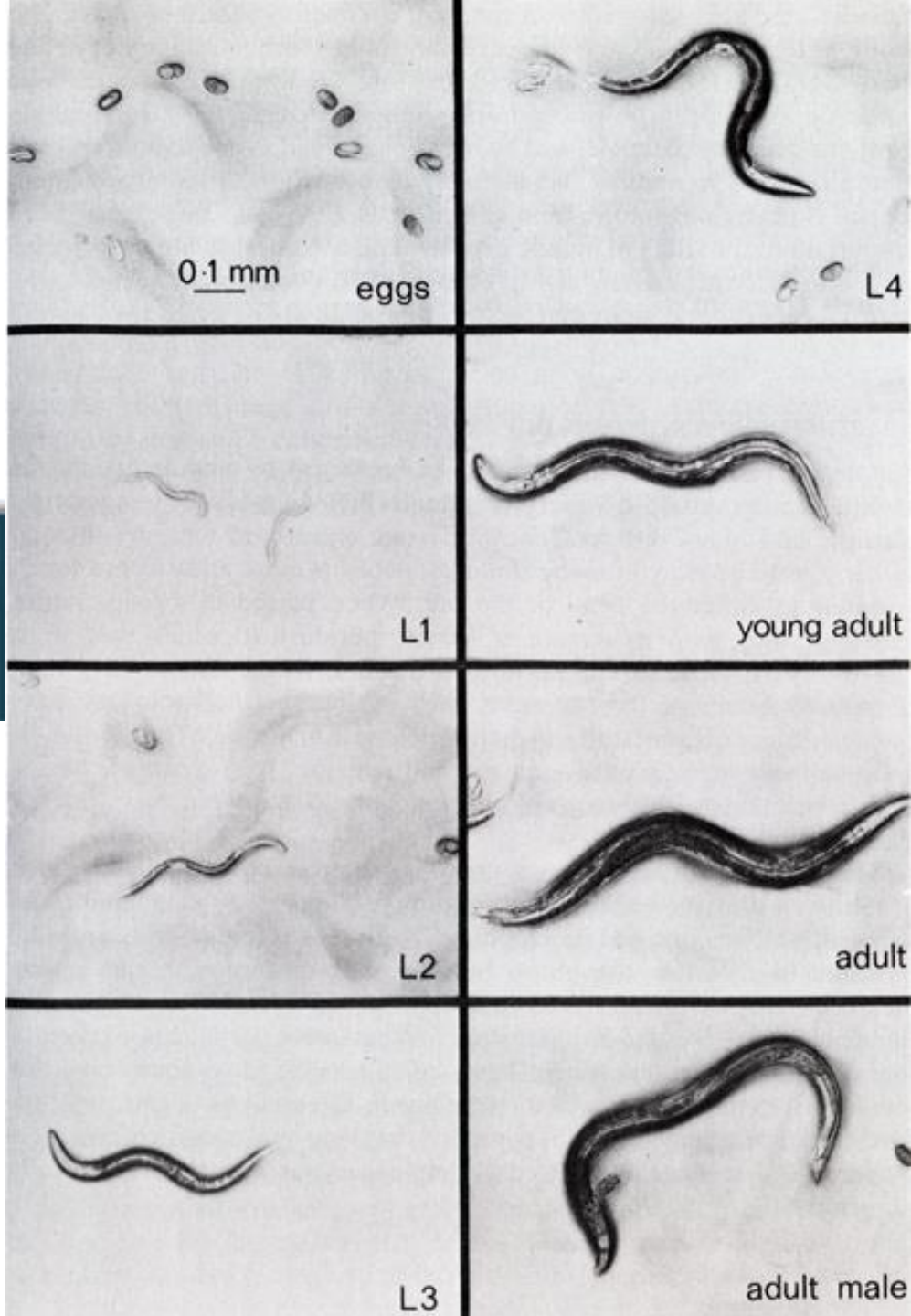
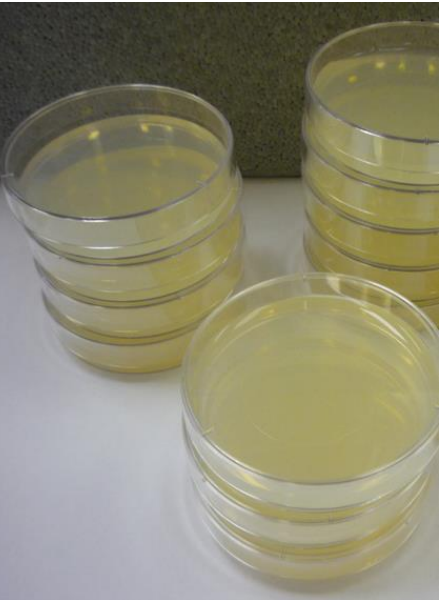
***C. elegans*, mint genetikai modell rendszer**



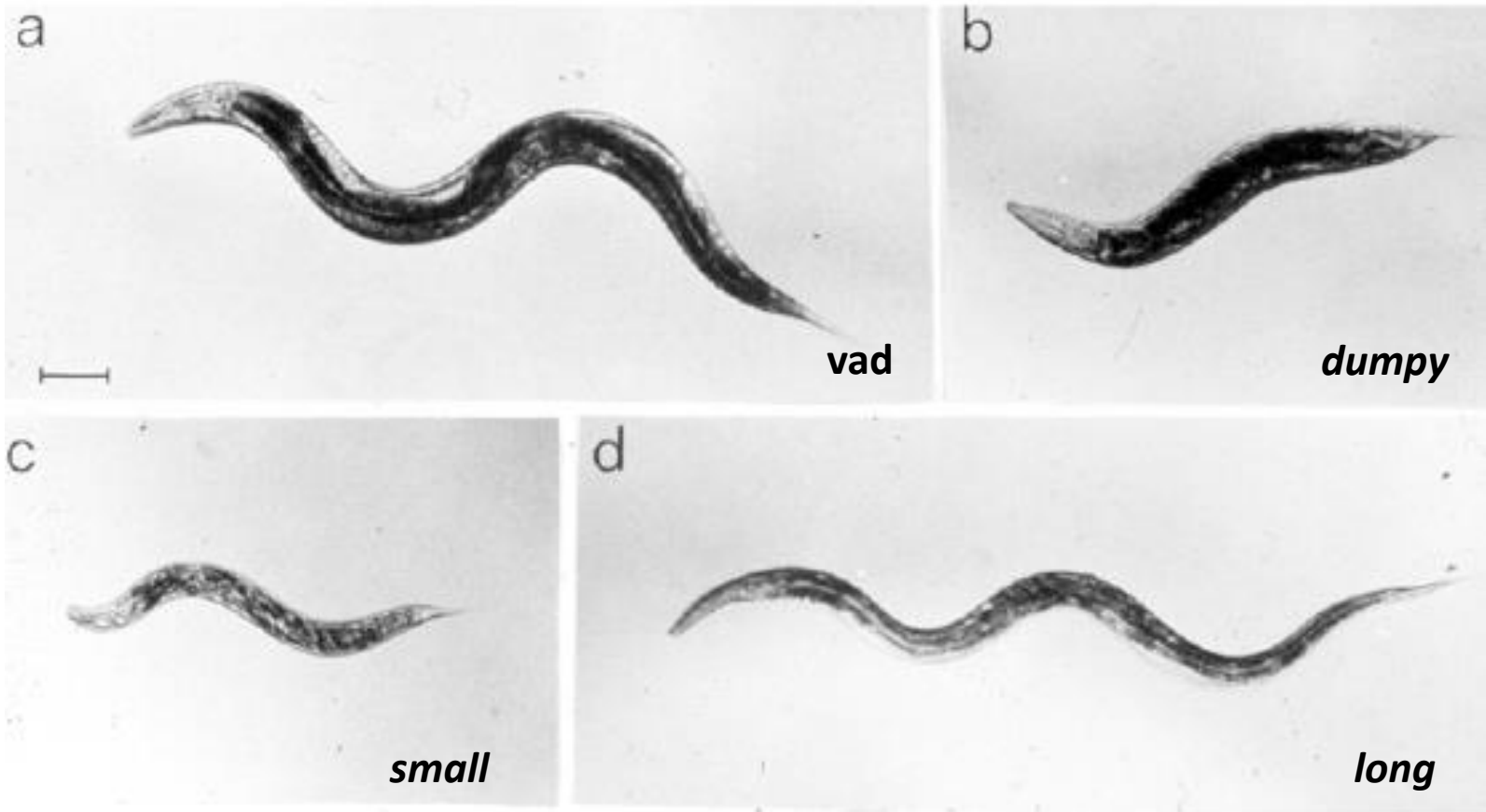
Előnyök:

- 1. Laboratóriumban könnyen fenntartható (agar tartalmú Petri lemezekén)**
- 2. Egyszerű anatómia (959 testi sejt, 302 neuron. Transzparens test!!!)**
- 3. Kis testméret (1.2 mm)**
- 4. Nagy egyedszám (250 utód generációnként)**
- 5. Gyors élelciklus (kb. 3 nap 25 °C-on)**
- 6. Speciális szexuális dimorfizmus: önmegtermékenyítő hímnősek (hermafroditák) és hímek. A hímnősek a tiszta genetikai vonalak fenntartását (nincs hímekkel történő keresztezés), a hímek a genetikai vonalak kombinálást (pl. kettős mutánsok előállítás) teszik lehetővé.**

Fenntartás



Morfológiai mutáns fenotípusok

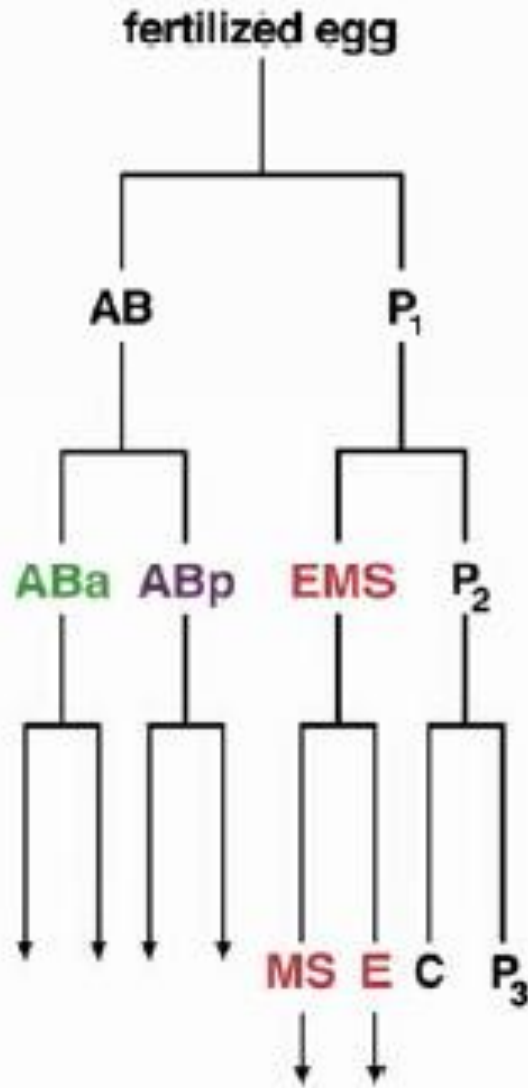
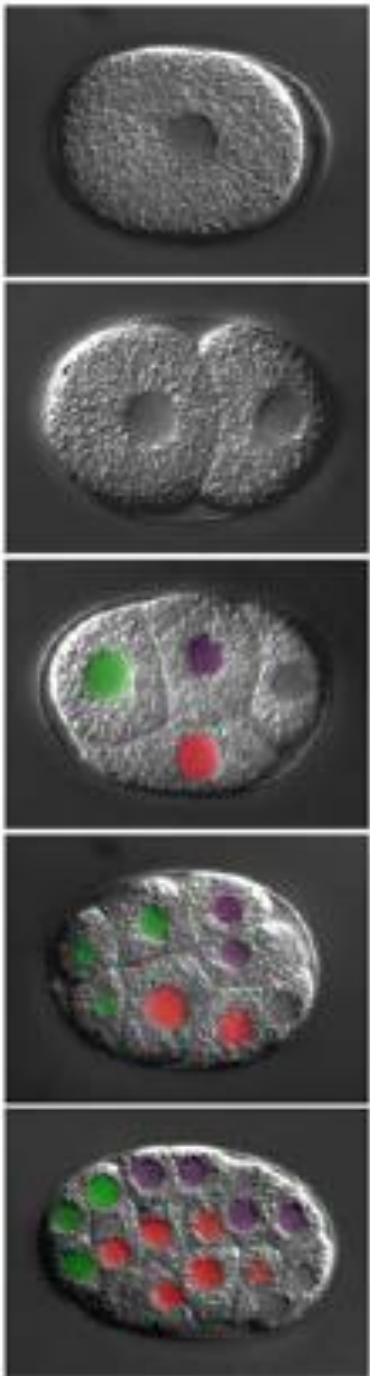


a. wild type b. Dpy c. Sma d. Lon

Az embrió burka (*egg shell*) átlátszó: fénymikroszkóp segítségével az egyedfejlődés nyomon követhető

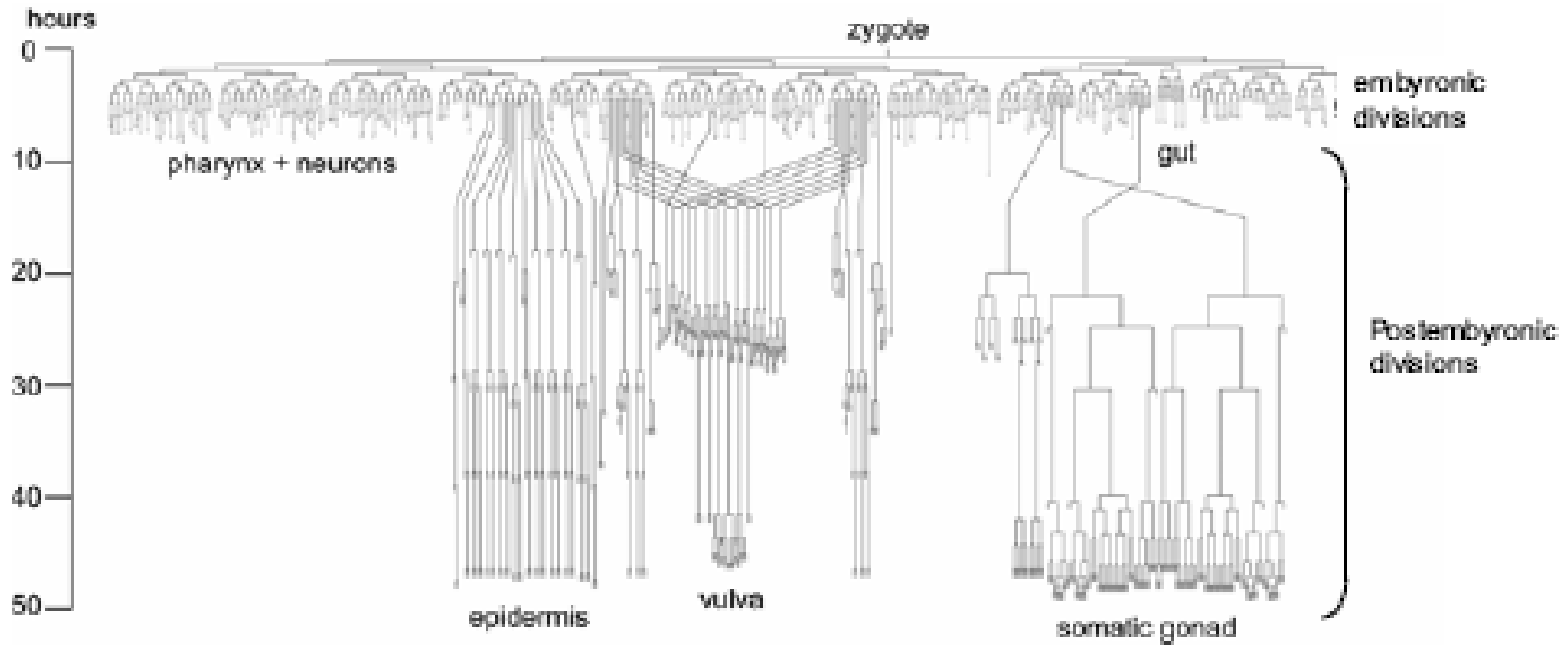
Genetikai vizsgálatok egyedi sejtszinten (*at the single-cell level*)





**Blasztoméra
képződése**

Invariáns sejtvoal

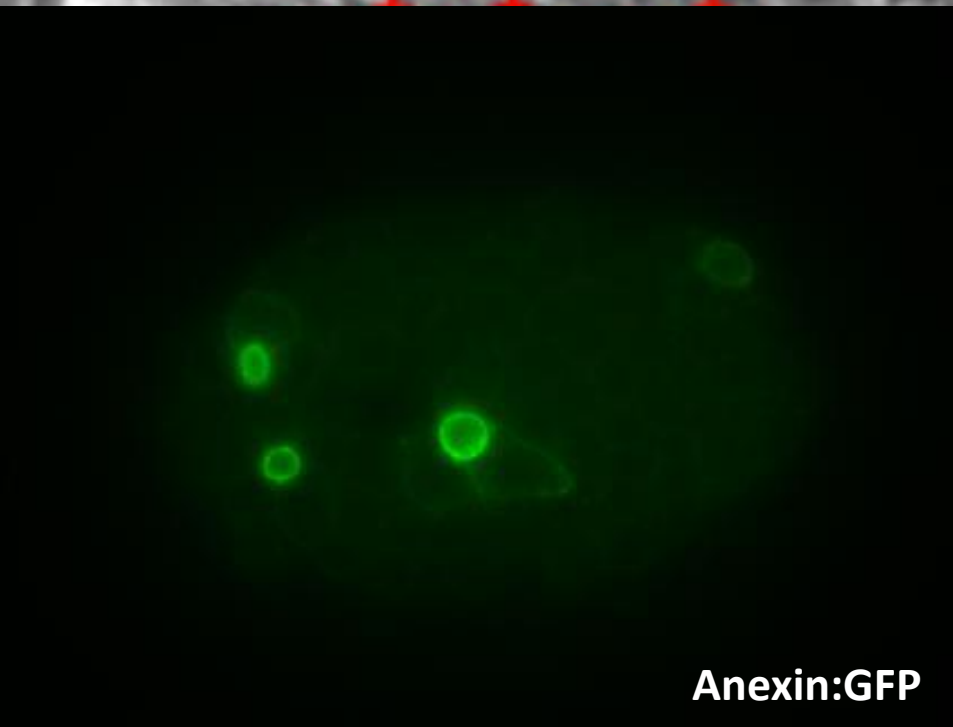
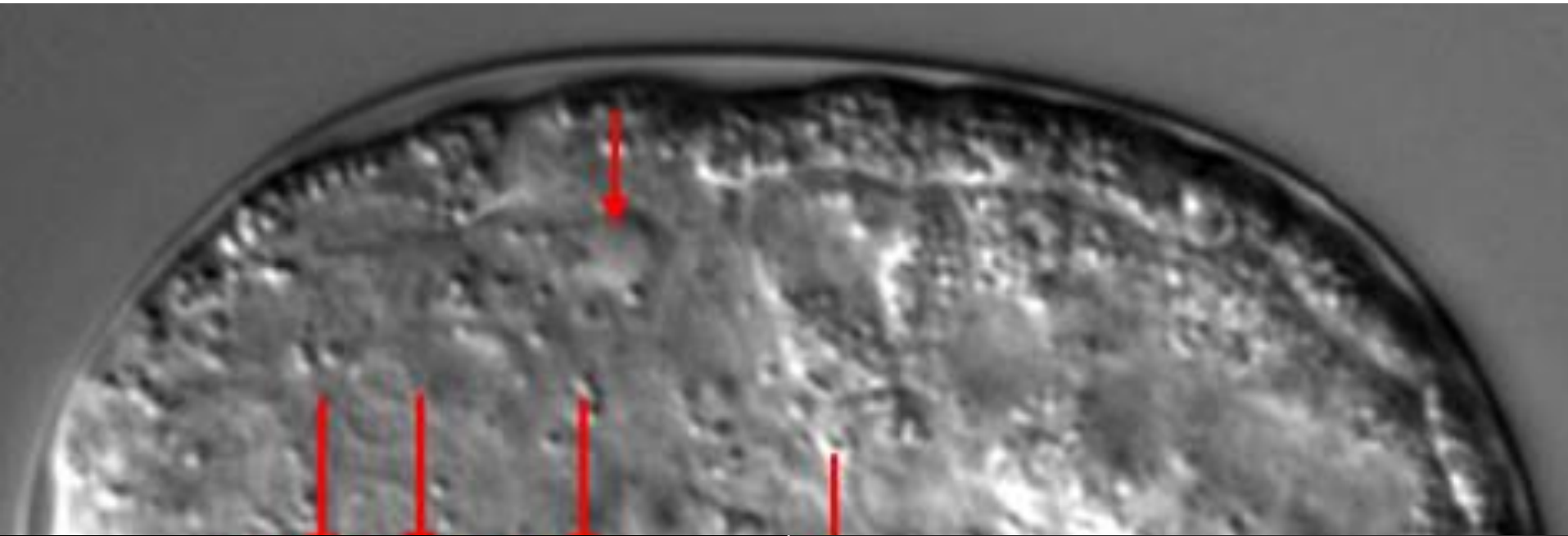


959 somatic cells (adult hermaphrodite)

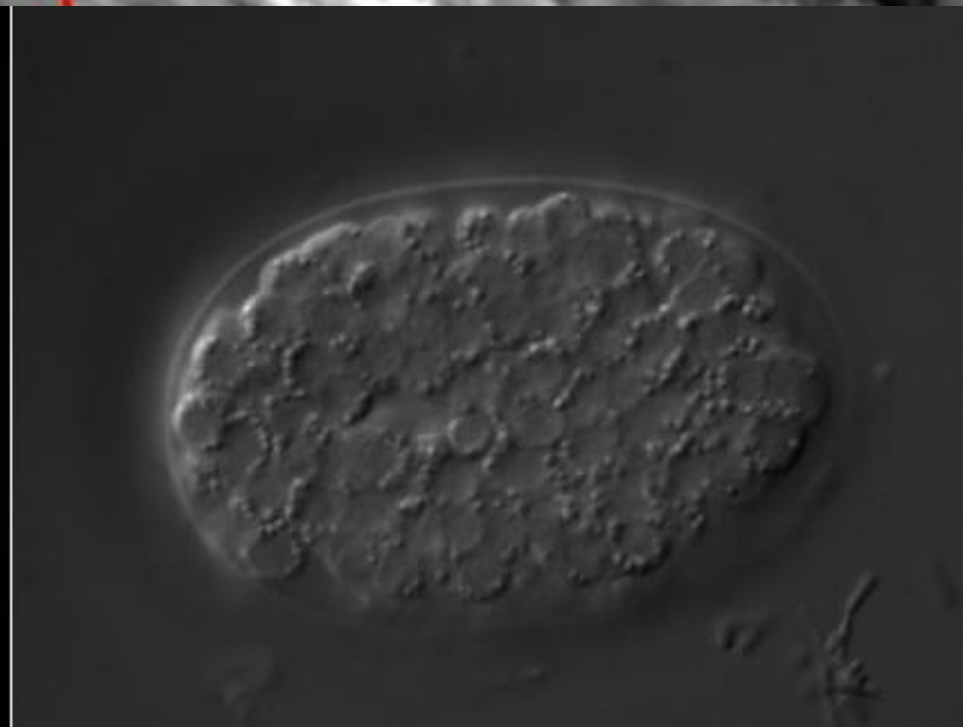


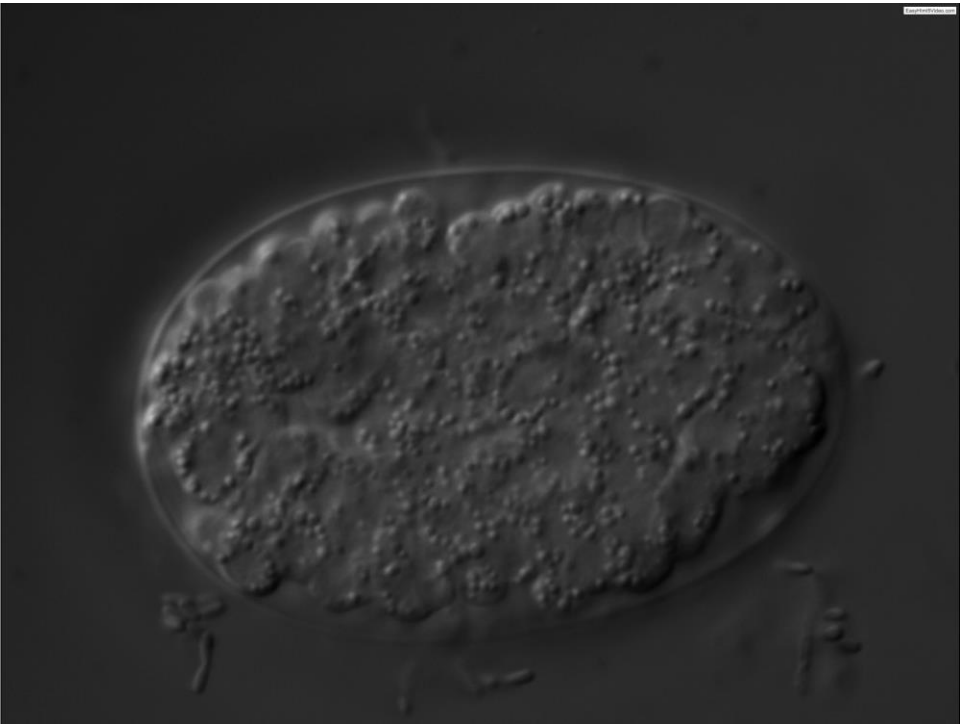
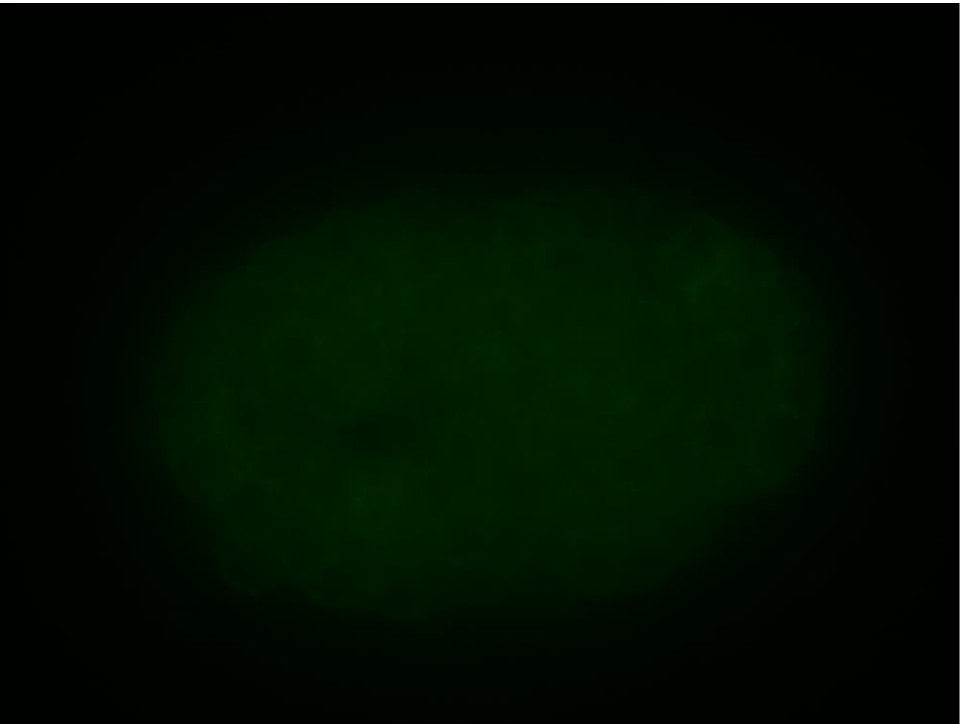
(John Sulston, Bob
Horvitz, Judith Kimble
1977-1983)

Apoptózis (programozott sejthalál) *C. elegans* embrióban

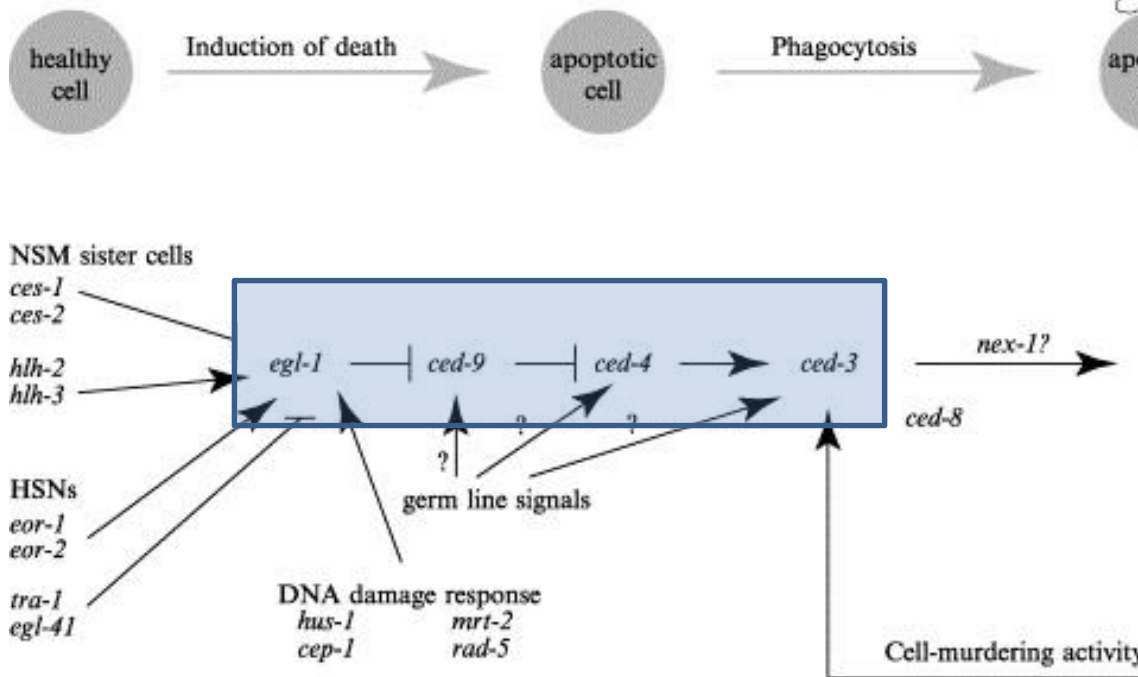


Anexin:GFP





Apoptózis (programozott sejthalál) genetikai útvonala

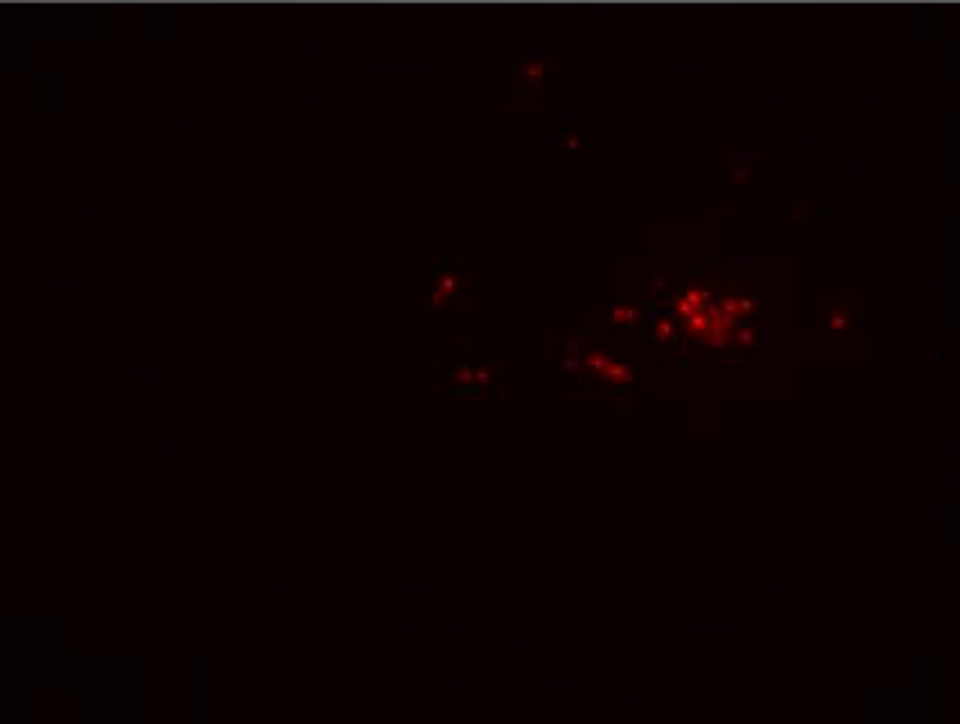


Robert Horvitz
Nobel Prize, 2002

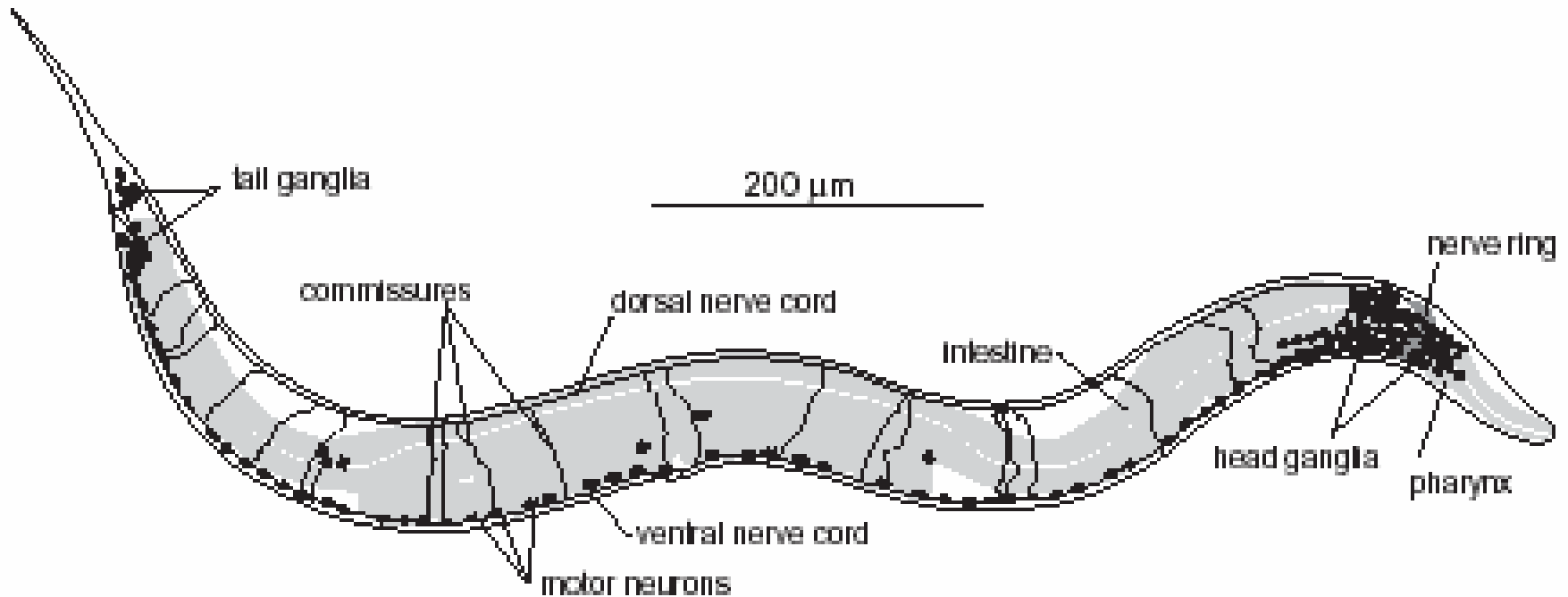




Apai mitokondriumok eltávolítása (autofágiával)



Egyszerű idegrendszer (302 neuron)



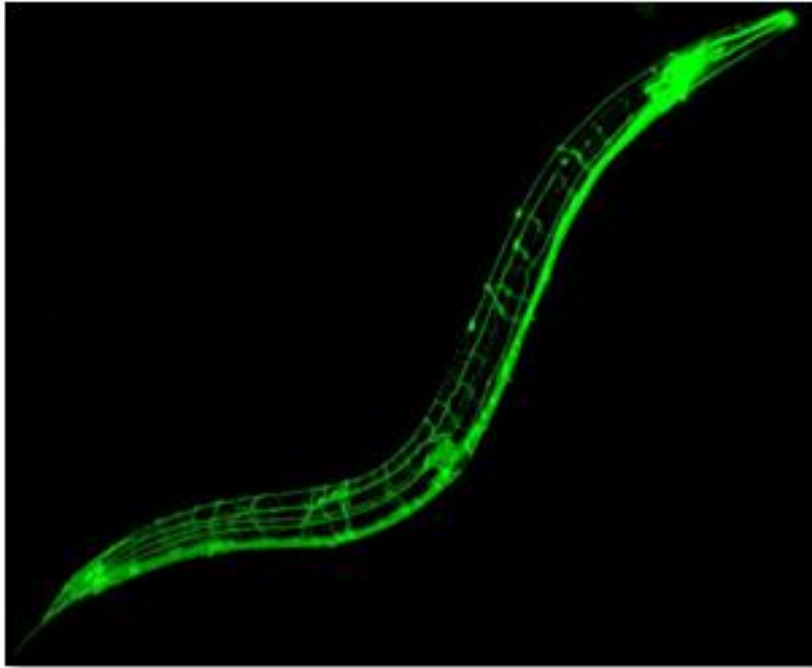
302 neurons, ~5000 synapses

Az idegrendszer elektronmikroszkópos (sorozat)metszete



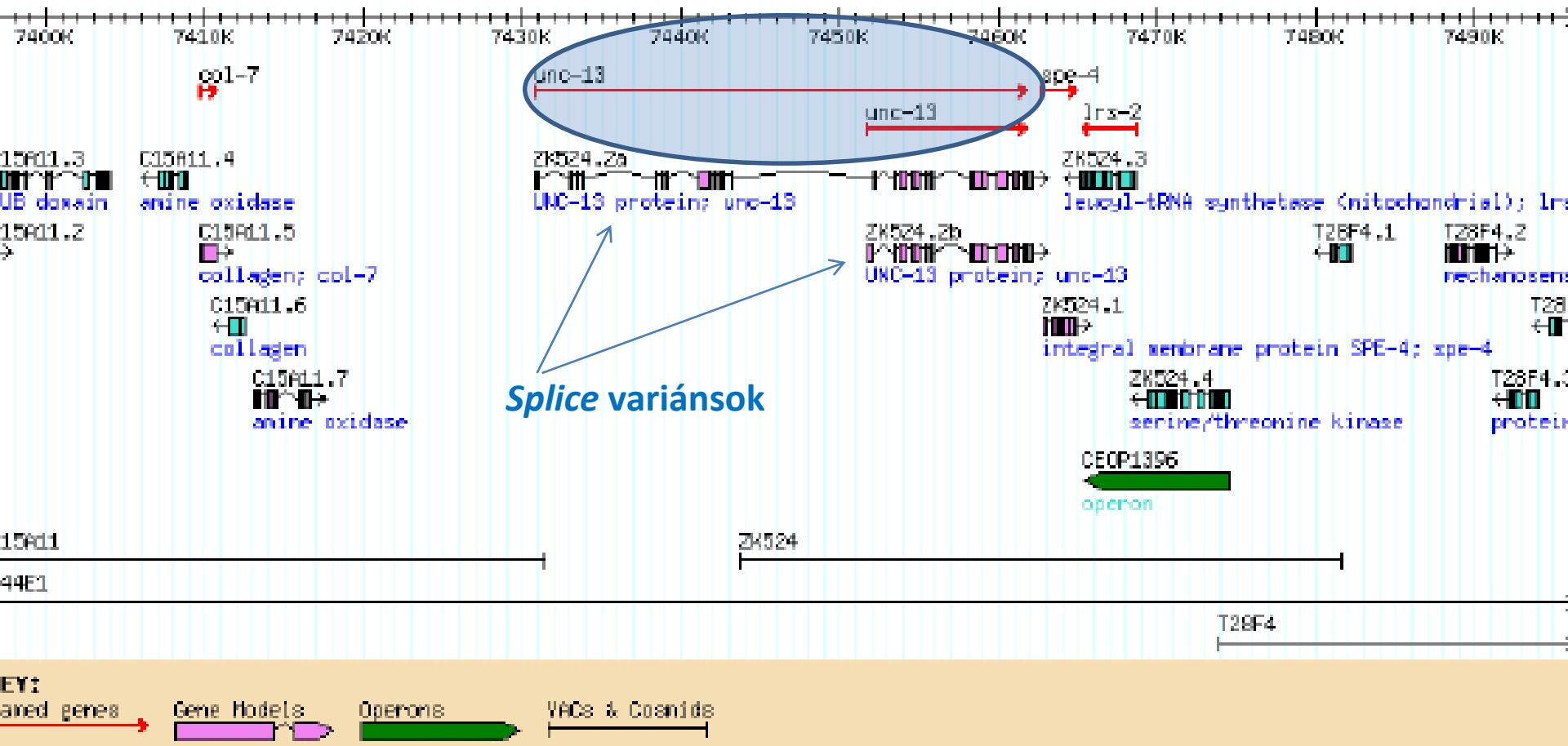
1251

Idegrendszer-specifikus fehérjék expressziója *in vivo*



Genom annotálás: ORF-ek (*open reading frame*) meghatározása

wormbase



Splice variánsok

Genetikai transzformáció: instrumentumok

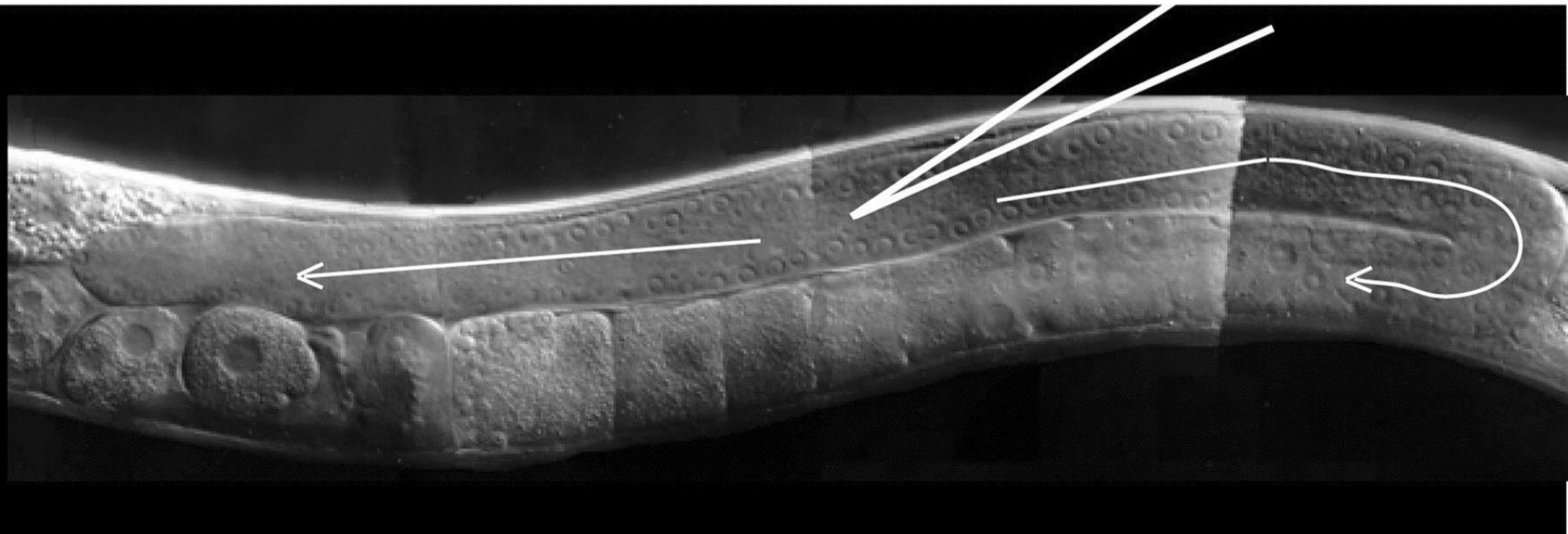
mikroinjektor



génpuska

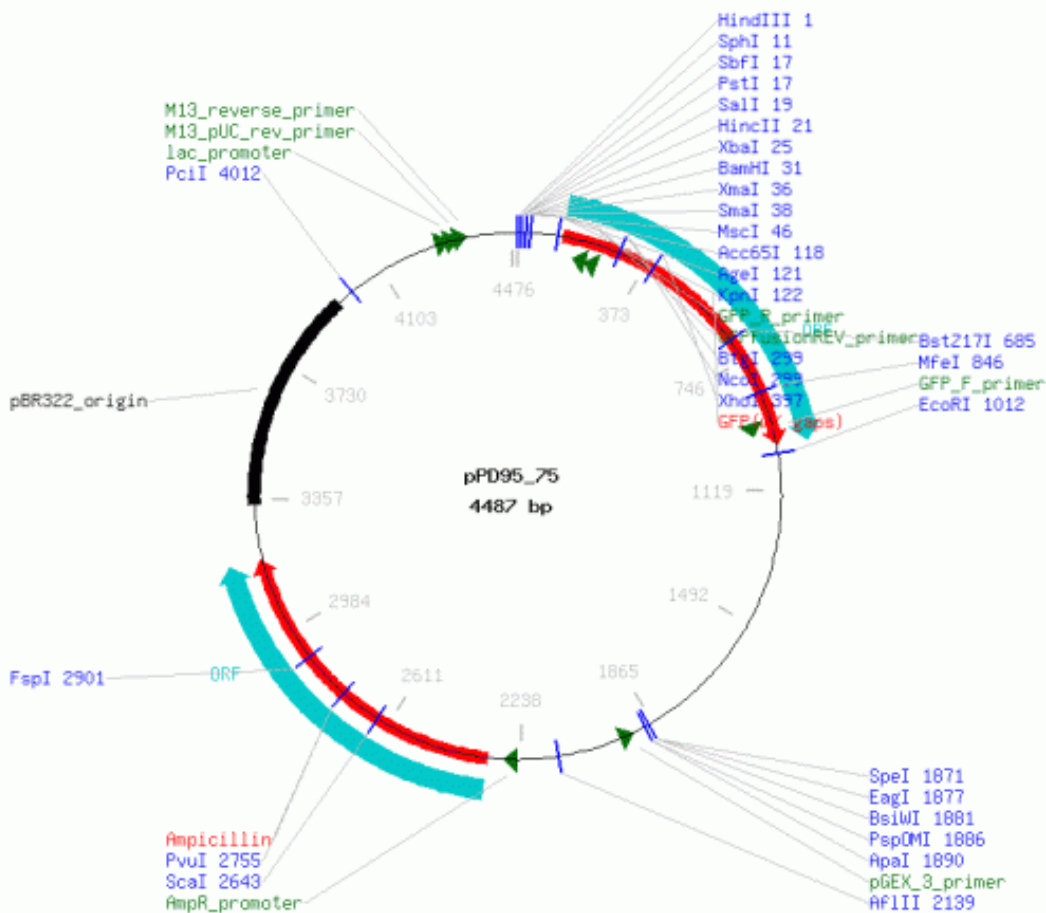


Géntranszfer *C. elegans* csíravonal prekurzor sejtekbe

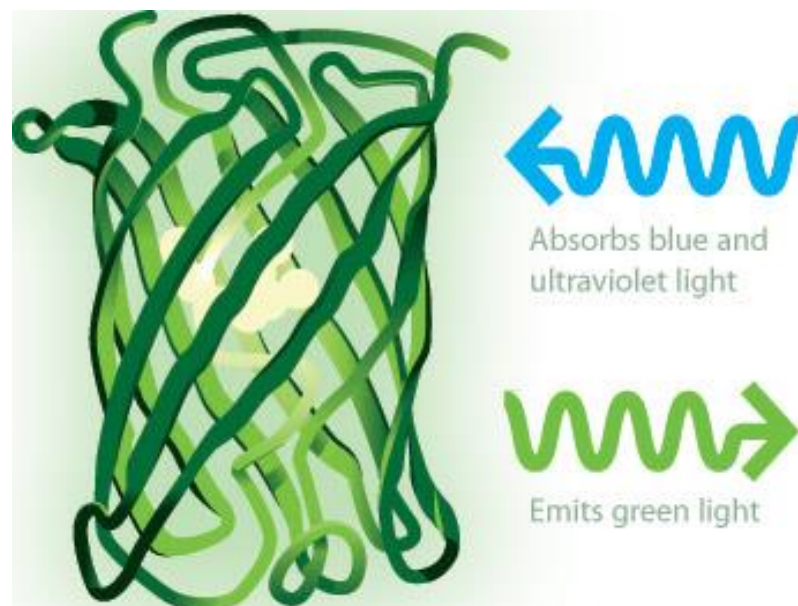


Expressziós analízis

Mikor (az egyedfejlődés mely stádiumában) és hol (mely sejtekben) fejeződik ki egy gén.

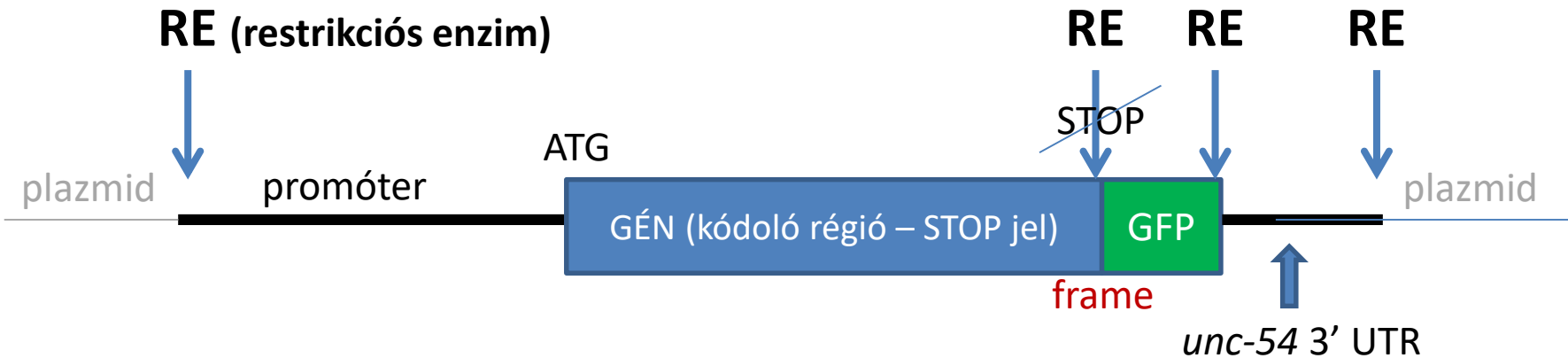
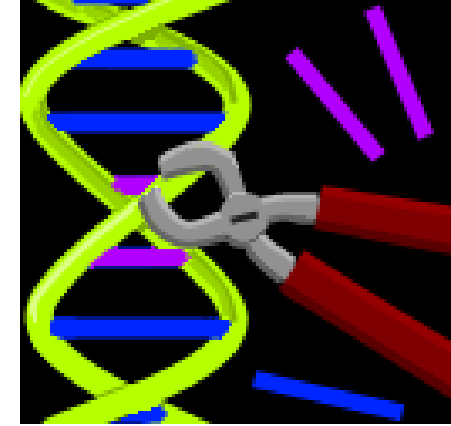


Expressziós vektor



GFP: green fluorescent protein

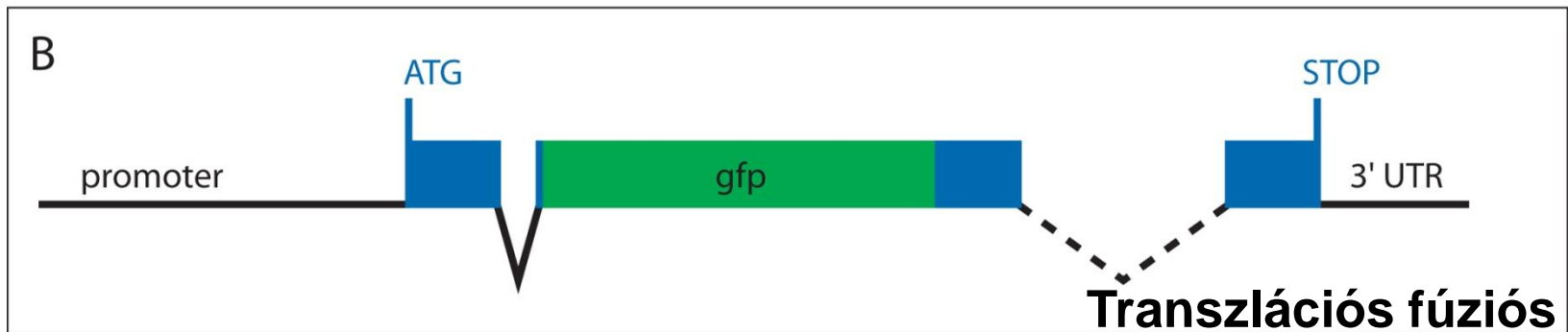
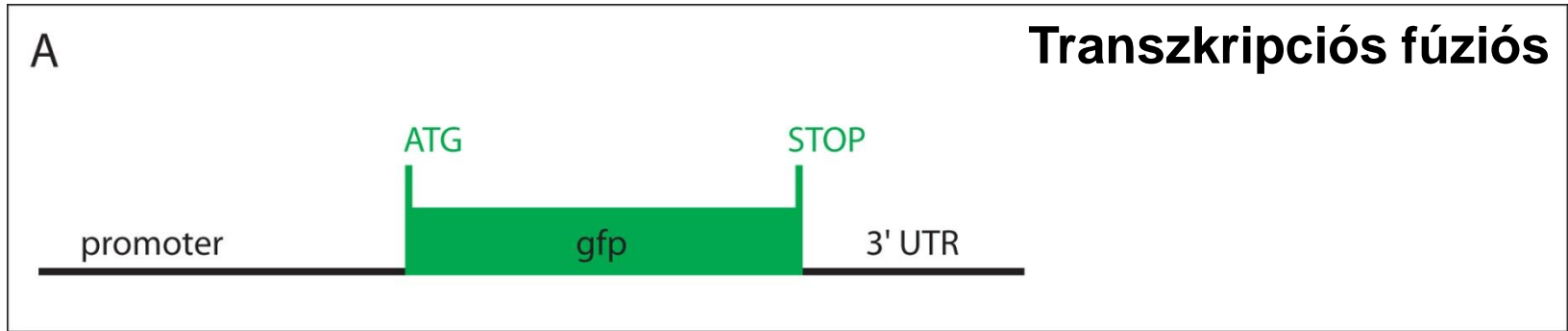
Expressziós konstrukciók



Minden génre megtervezhető – genom-szintű erőfeszítések.

- **GFP analízis vs. antitest festés – melyik jobb?**
- **Transzkripció fúziós rendszer**
- **Transzláció fúziós rendszer – mutáns menekítés**

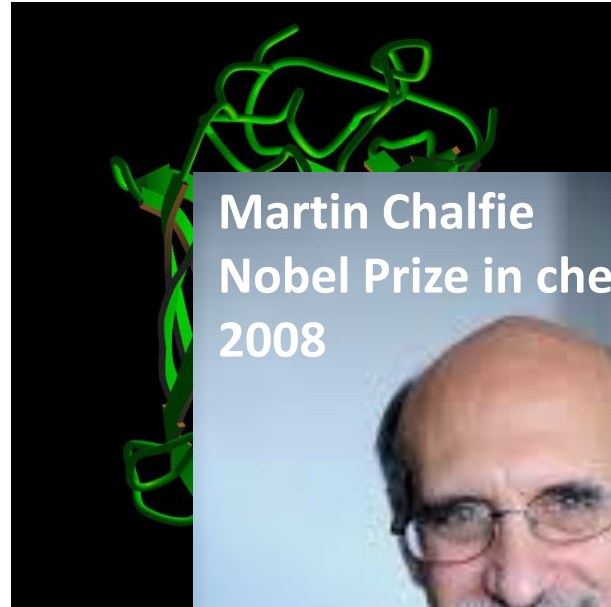
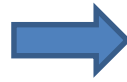
GFP konstrukciók



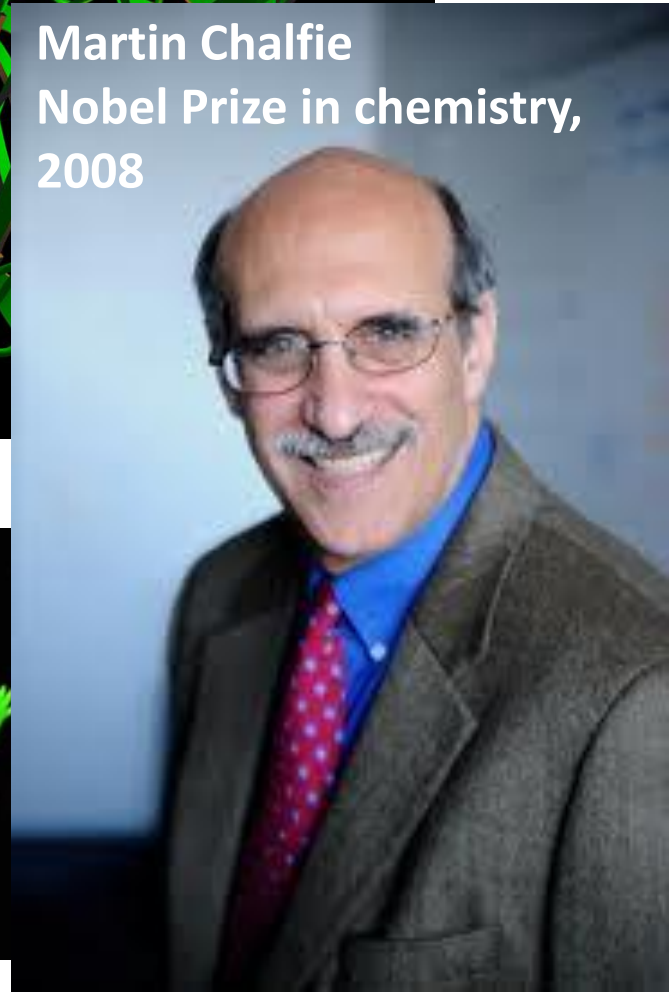
GFP



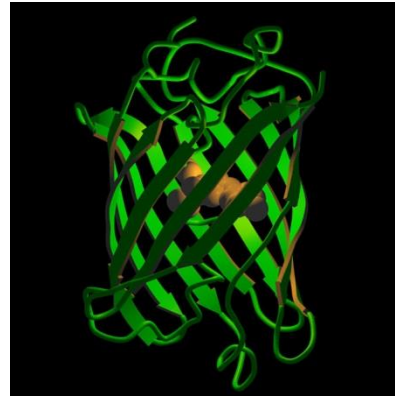
Aequorea victoria, medúza



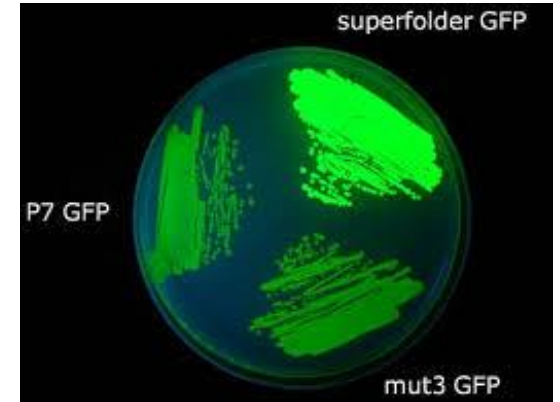
Martin Chalfie
Nobel Prize in chemistry,
2008



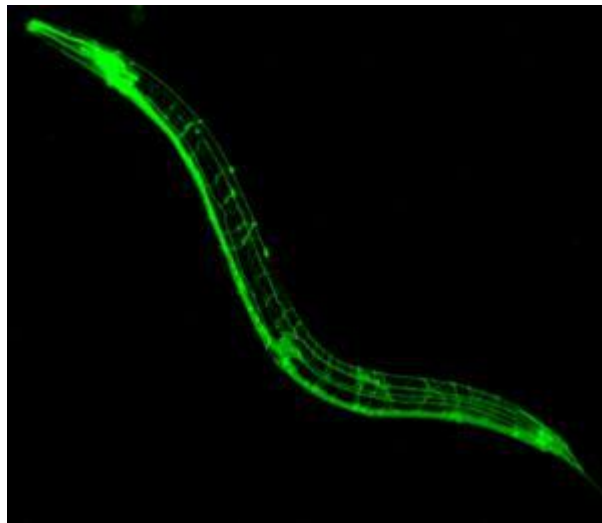
Valójában



GFP



Escherichia coli



Caenorhabditis elegans



Minden más

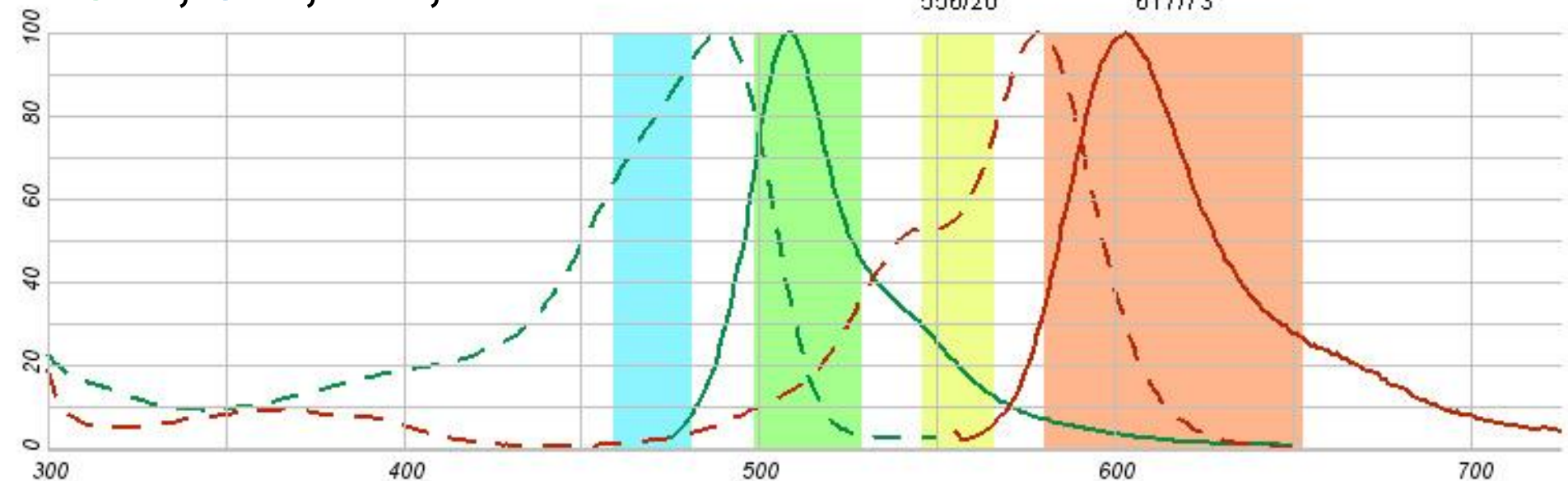
GFP, CFP, YFP, RFP

470/22

514/30

556/20

617/73



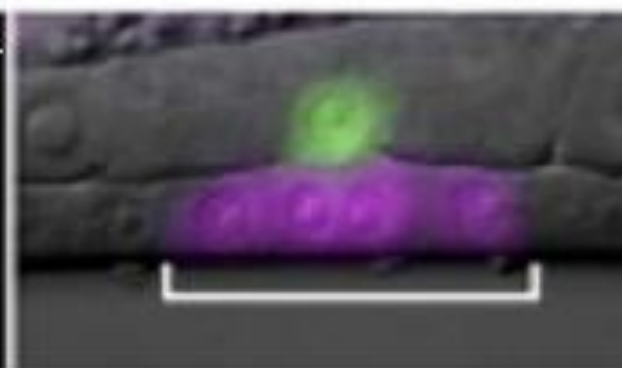
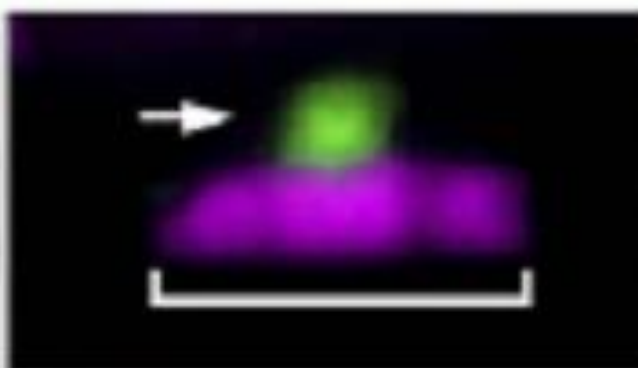
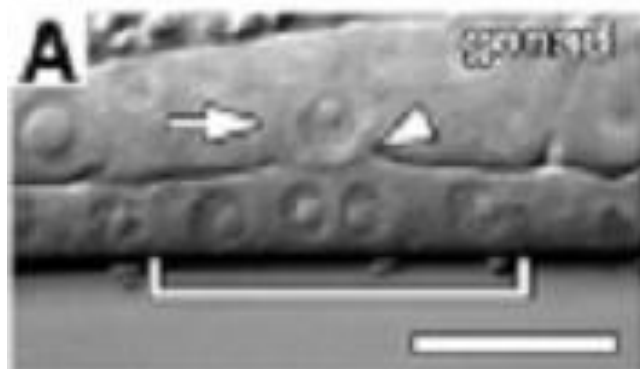
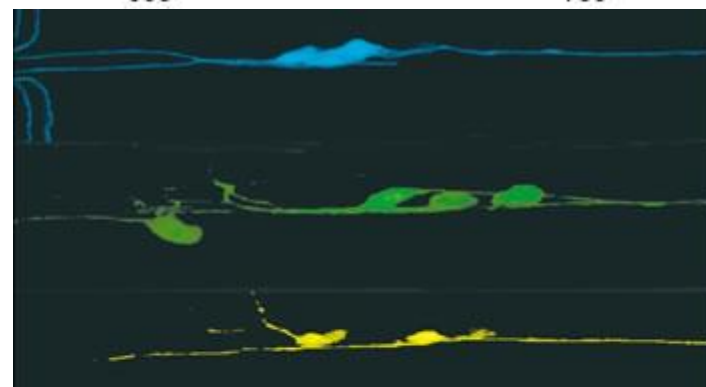
GFP, CFP, YFP, RFP

G: green

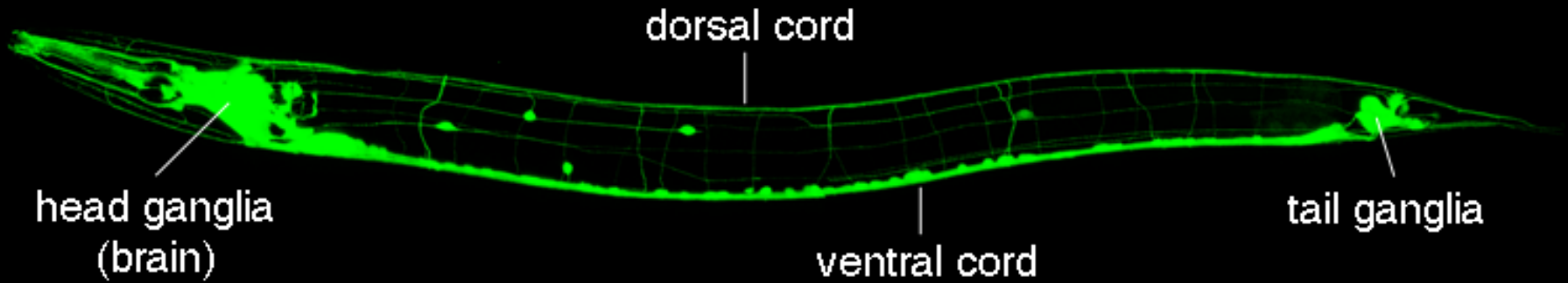
C: cyan

Y: yellow

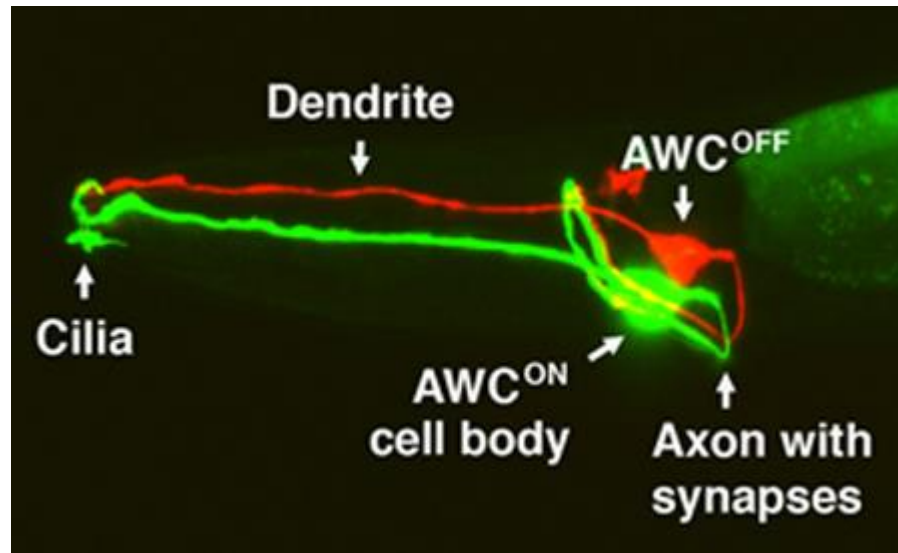
R: red



Neuronális GFP expresszió



Neuronális GFP-RFP expresszió

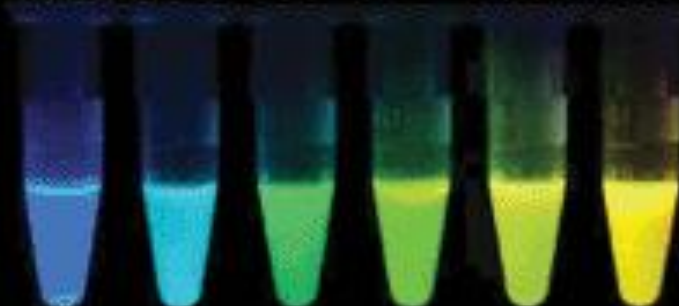


Ko-expresszió:

sárga

The 2004 palette of nonoligomerizing fluorescent proteins

GFP-derived				mRFP1-derived								Evolved by SHM				
Exc.	380	433/452	488	516	487/504	540	548	554	568	574	587	595	596	605	590	nm
Em.	440	475/505	509	529	537/562	553	562	581	585	596	610	620	625	636	648	nm



EBFP

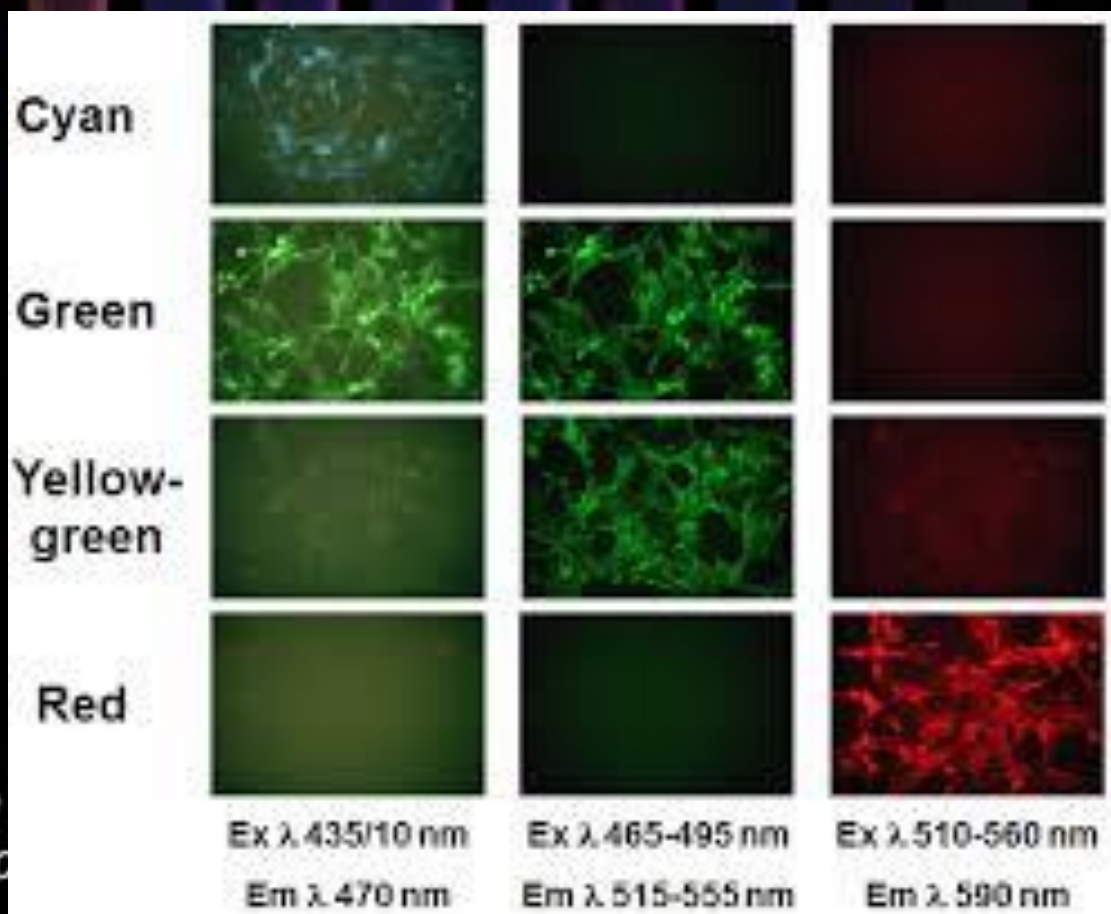
ECFP

EGFP

YFP (Citrine)

mHoneydew

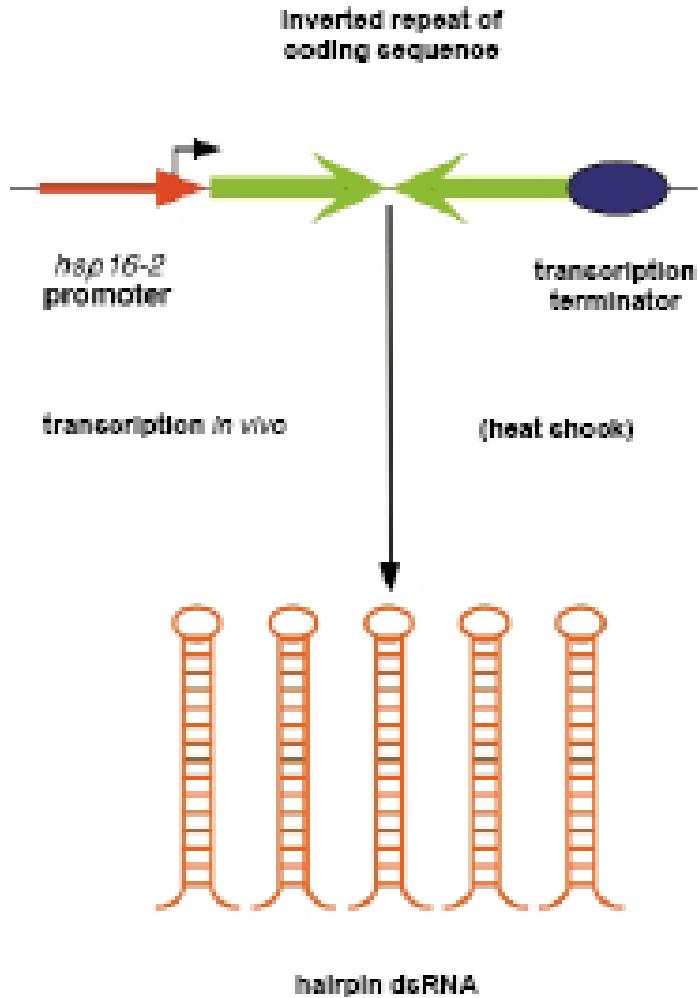
mBanana



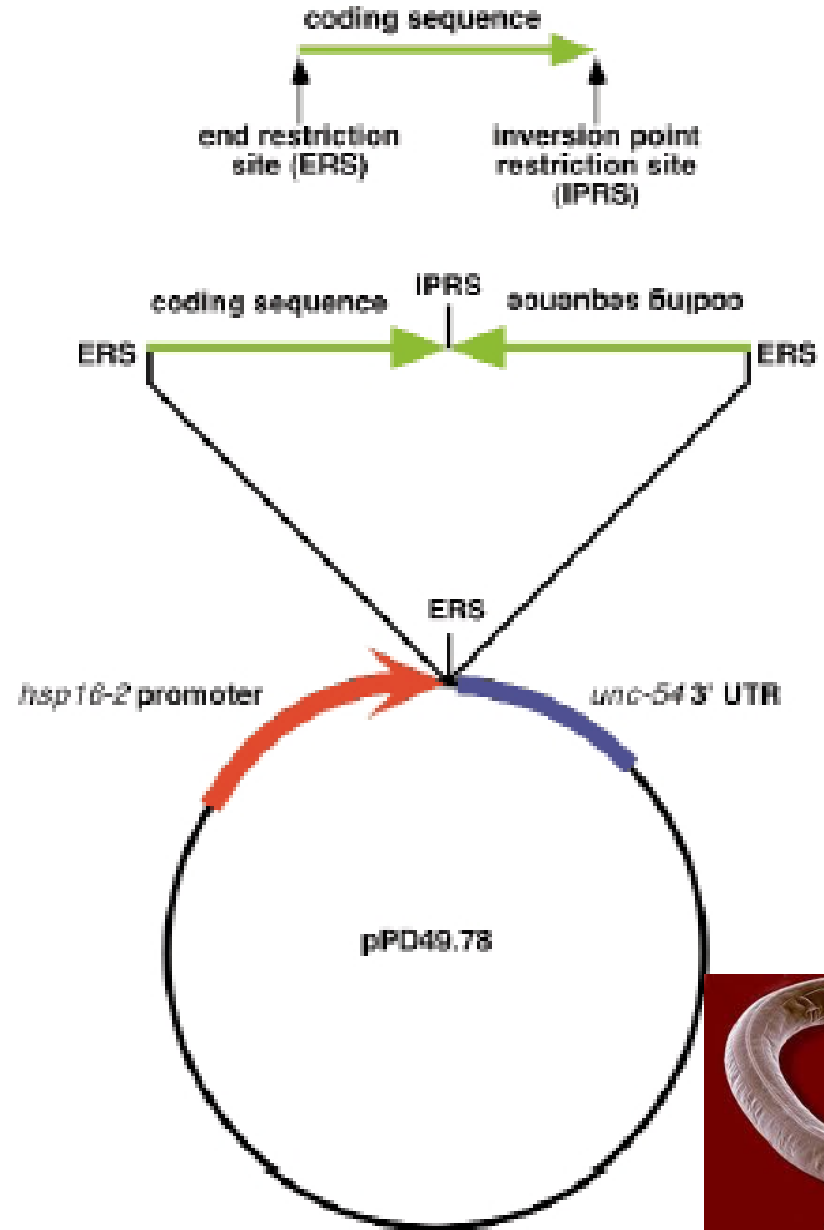
Nathan Shaner et al (2004) *Nature*
 Lei Wang et al (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Knockdown: RNSi könyvtárak – *C. elegans*

a



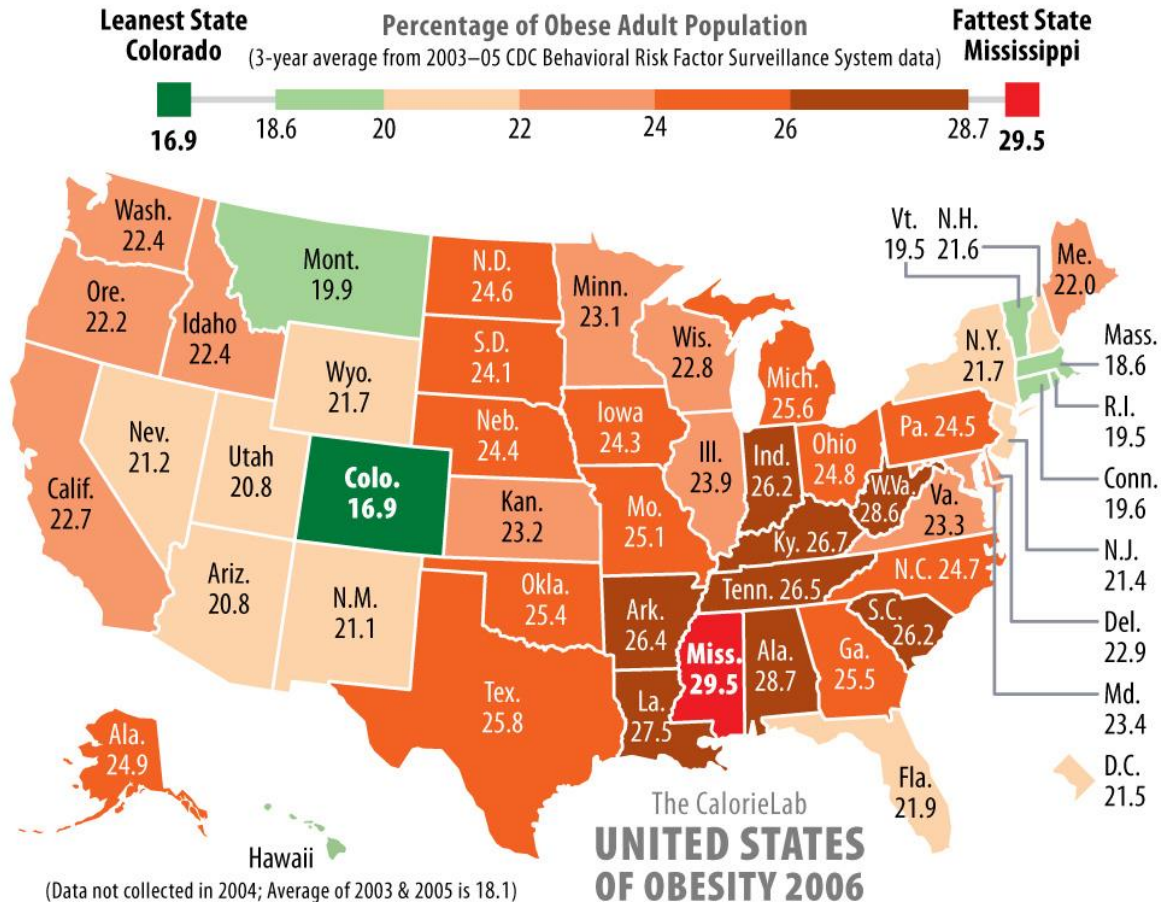
b



Zsíryanycserét szabályozó gének genomai analízise *C. elegans*ban



V:



Gének, melyek elhízást okozhatnak

C. elegans gének

Metabolic enzyme (7)

E04F6.3

F28F8.2

ZC513.1

C33A12.6

VF13D12L.1

Transcription factors (9)

C43H6.8

K10C3.6

F33D4.1

C56C10.10

C37F5.1

R11H6.5

H12C20.3

Receptors (6)

F56B6.5

C43H6.9

Y27F2A.g

Y46H3C_11.b

Vesicular transport (3)

F06H9.5

C04G2.4

Humán ortológ biológiai funkciója

Hydroxysteroid 17- β dehydrogenase

Long-chain fatty-acid CoA ligase

Phospholipid transfer protein

UDP-glucosyl transferase

Myo-inositol-1-phosphate synthase

Nhlh2/Nsd-2

NHF-4 α subtype NHR

Oestrogen-type NHR

Aryl hydrocarbon NHR

Ek-1

Interleukin enhancer factor 2

C4-type steroid receptor

Somatostatin receptor-type

Glutamate receptor

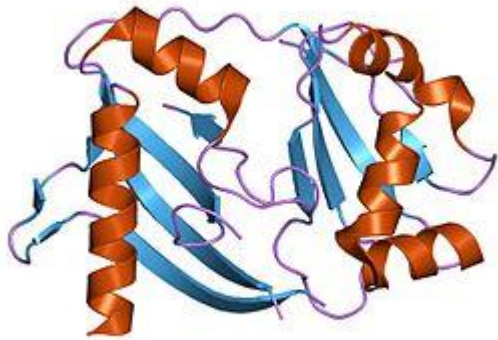
Chemoreceptor

GPCR

Oubilin/endocytic receptor

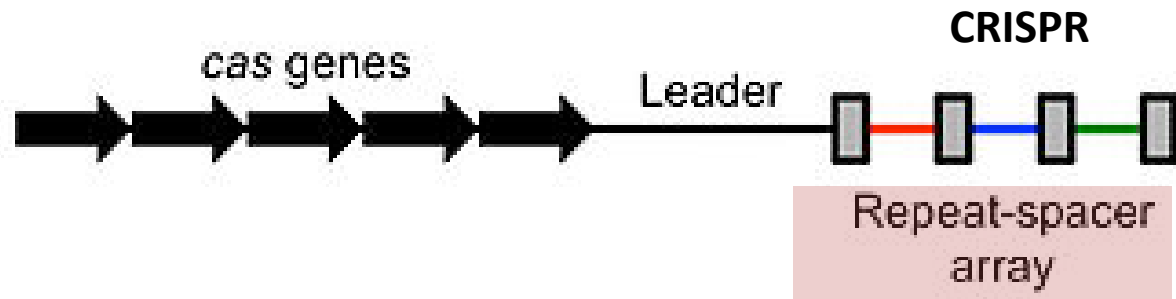
Vesicle associated protein

CRISPR- (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) Cas9 rendszer

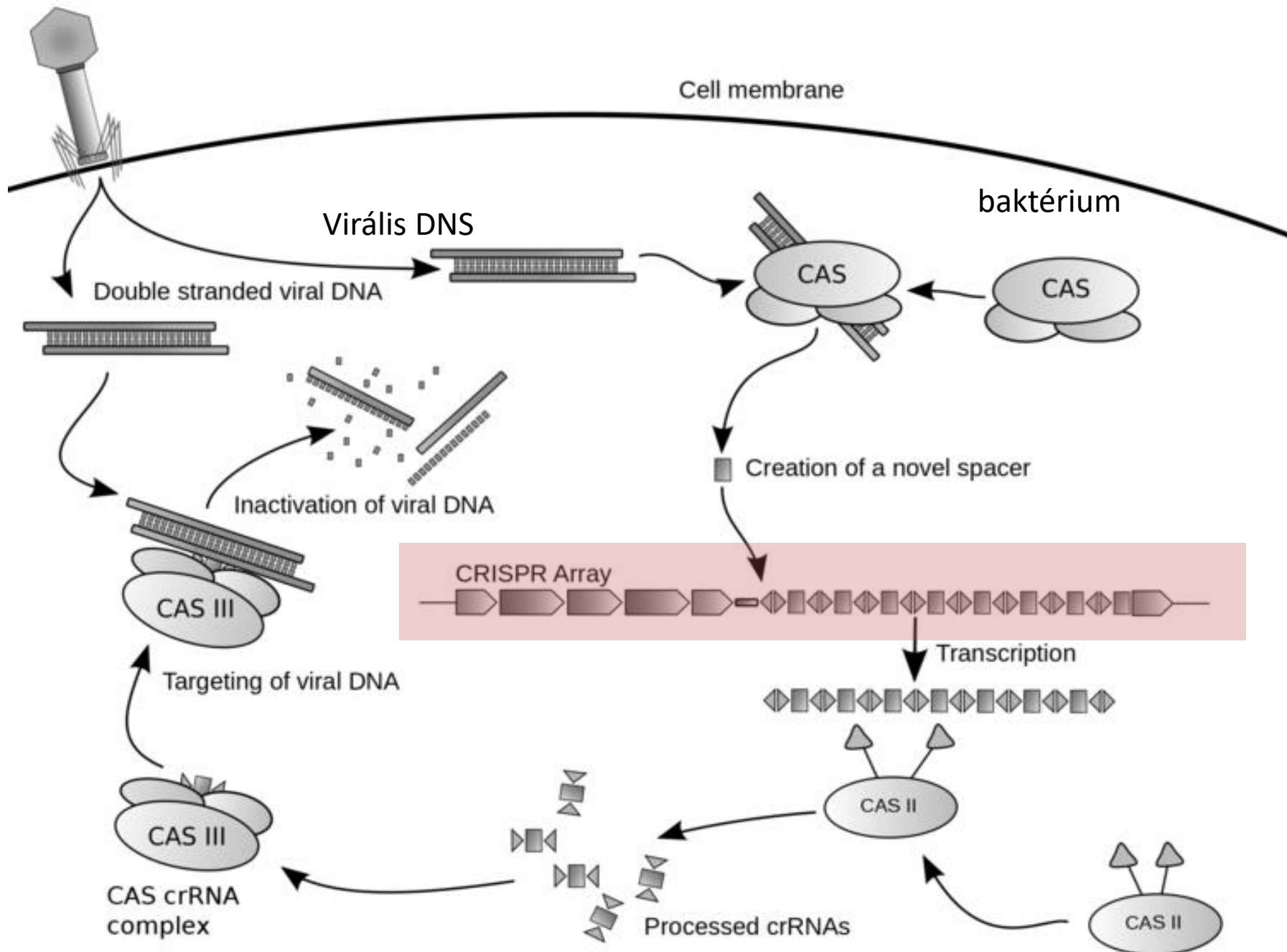


Cas9

Cas (*CRISPR-associated sequences*) fehérjék



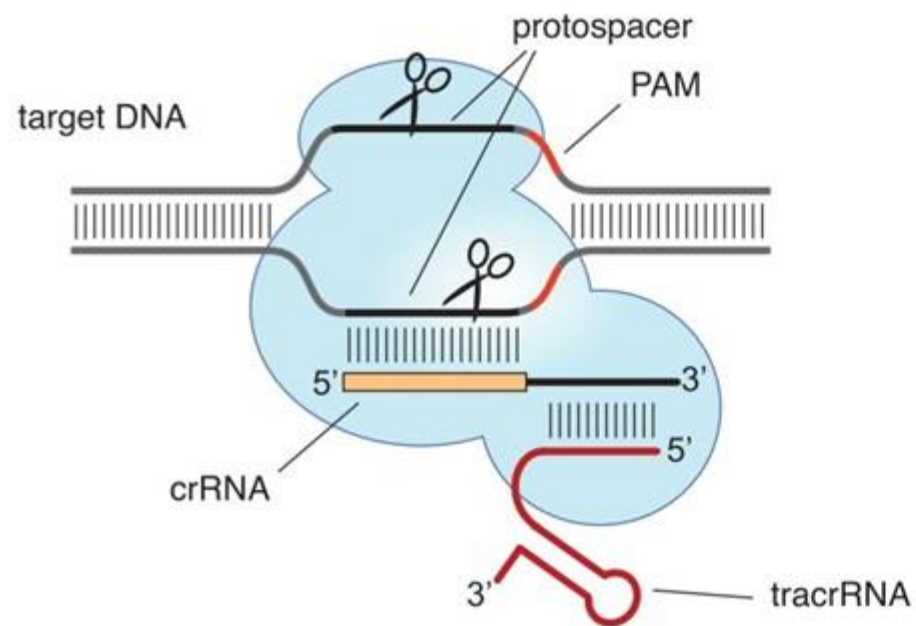
- Olyan DNS lokuszok, amelyek rövid ismétlődő szekvenciákat tartalmaznak *spacer*-ekkel elválasztva. Gyakran kapcsoltak *Cas* génekkel.
- Ilyen szekvenciák az Archaea-ák 90%-ában, az Bacteria-ák 40%-ában.



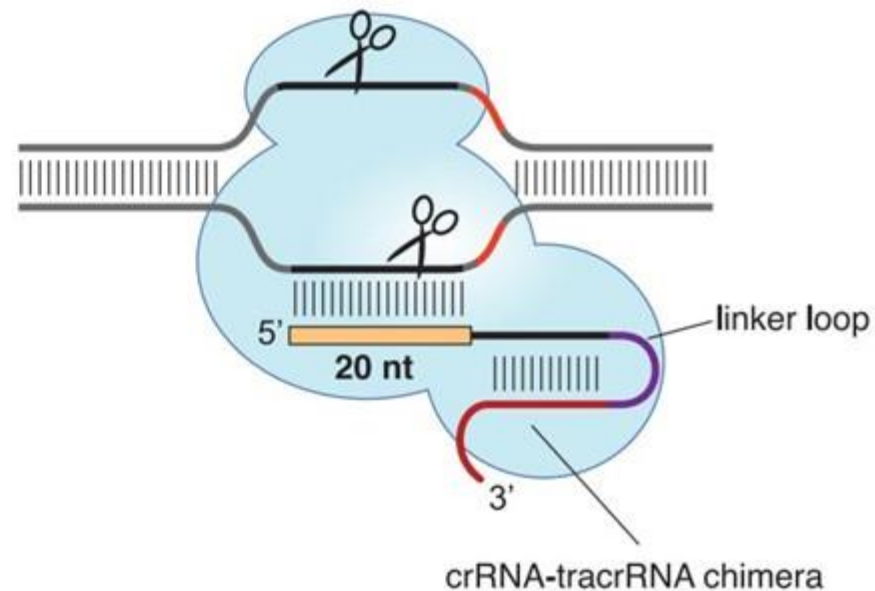


Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



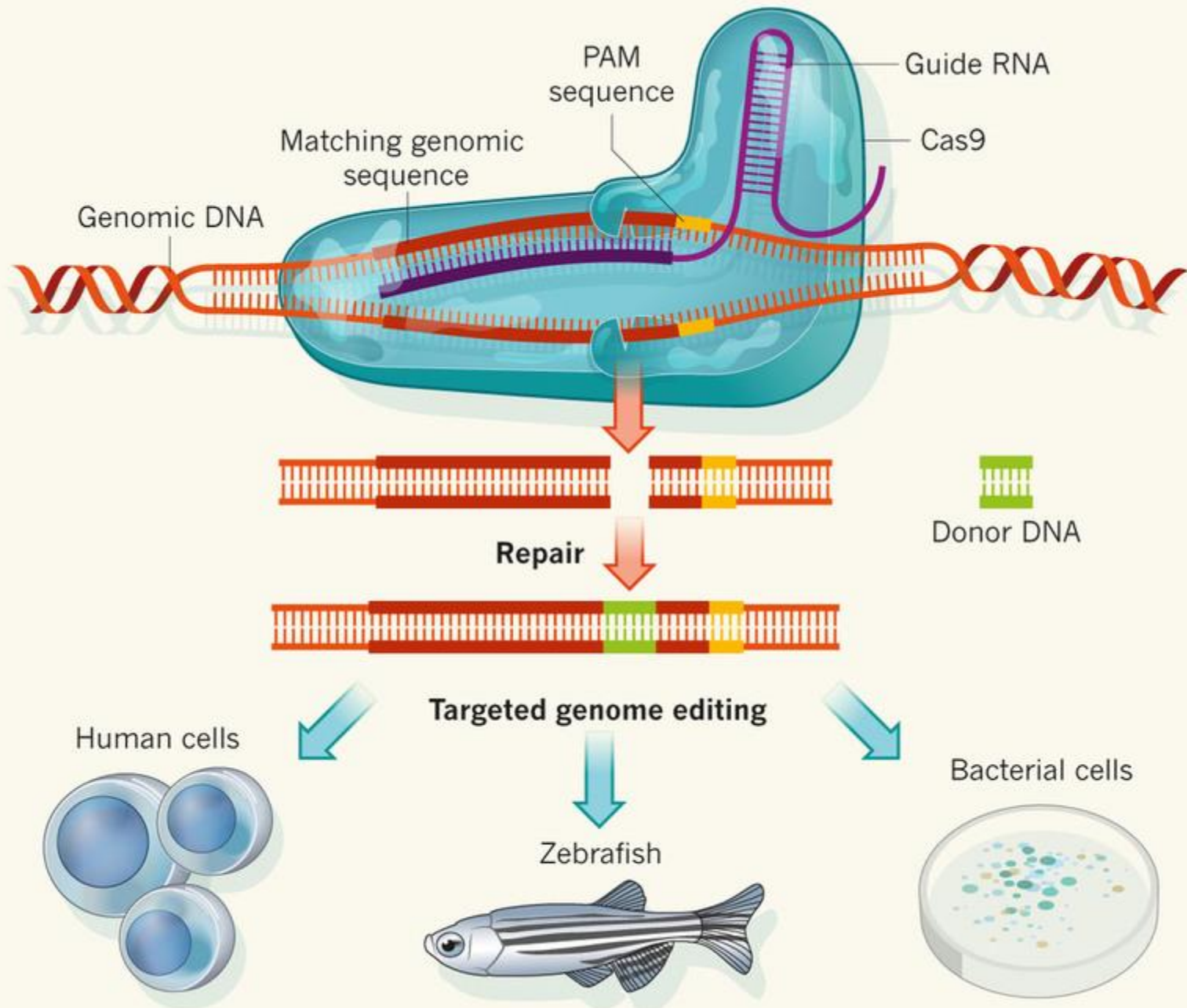
Cas9 programmed by single chimeric RNA



PAM: Protospacer adjacent motif (a Cas9 által megcélzott DNS szekvencia mögötti rész)

crRNA: CRISPR RNA

tracrRNA: trans-activating crRNA, a small trans-encoded RNA

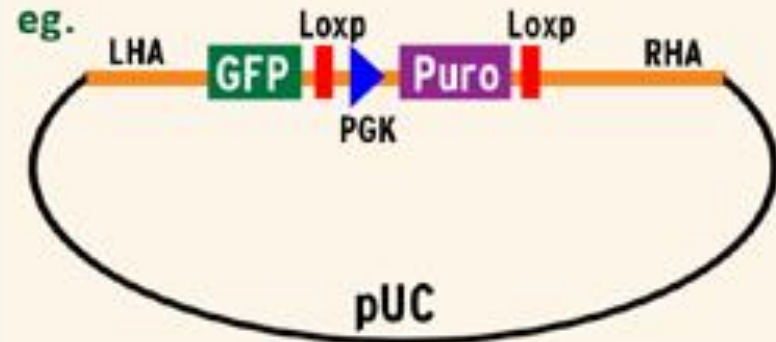


Genome-editing knockout kit using CRISPR/CAS9

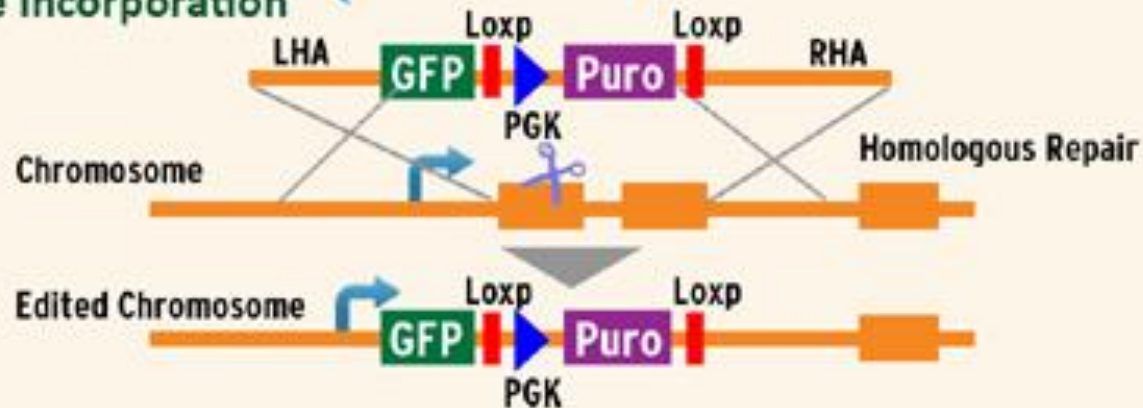
1 Target Sequence Cloned In pCas Guide Vector



2 Donor Template DNA Containing Homologous Arms & Functional Cassette



3 Genome Incorporation



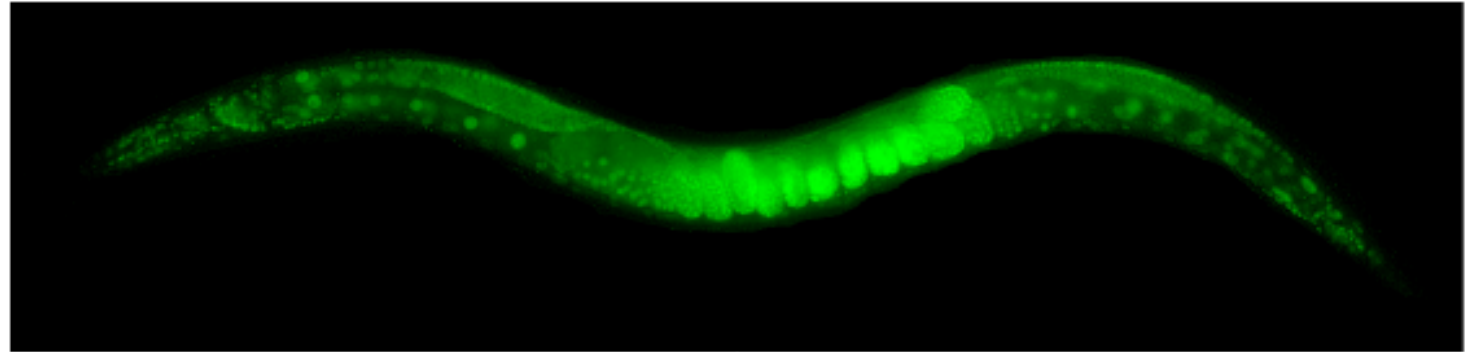
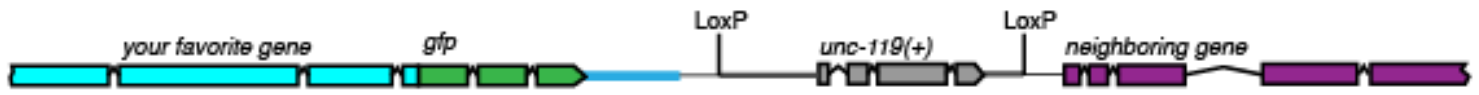


Inject Cas9-sgRNA plasmid
+
Homologous repair template

Engineered Repair Template



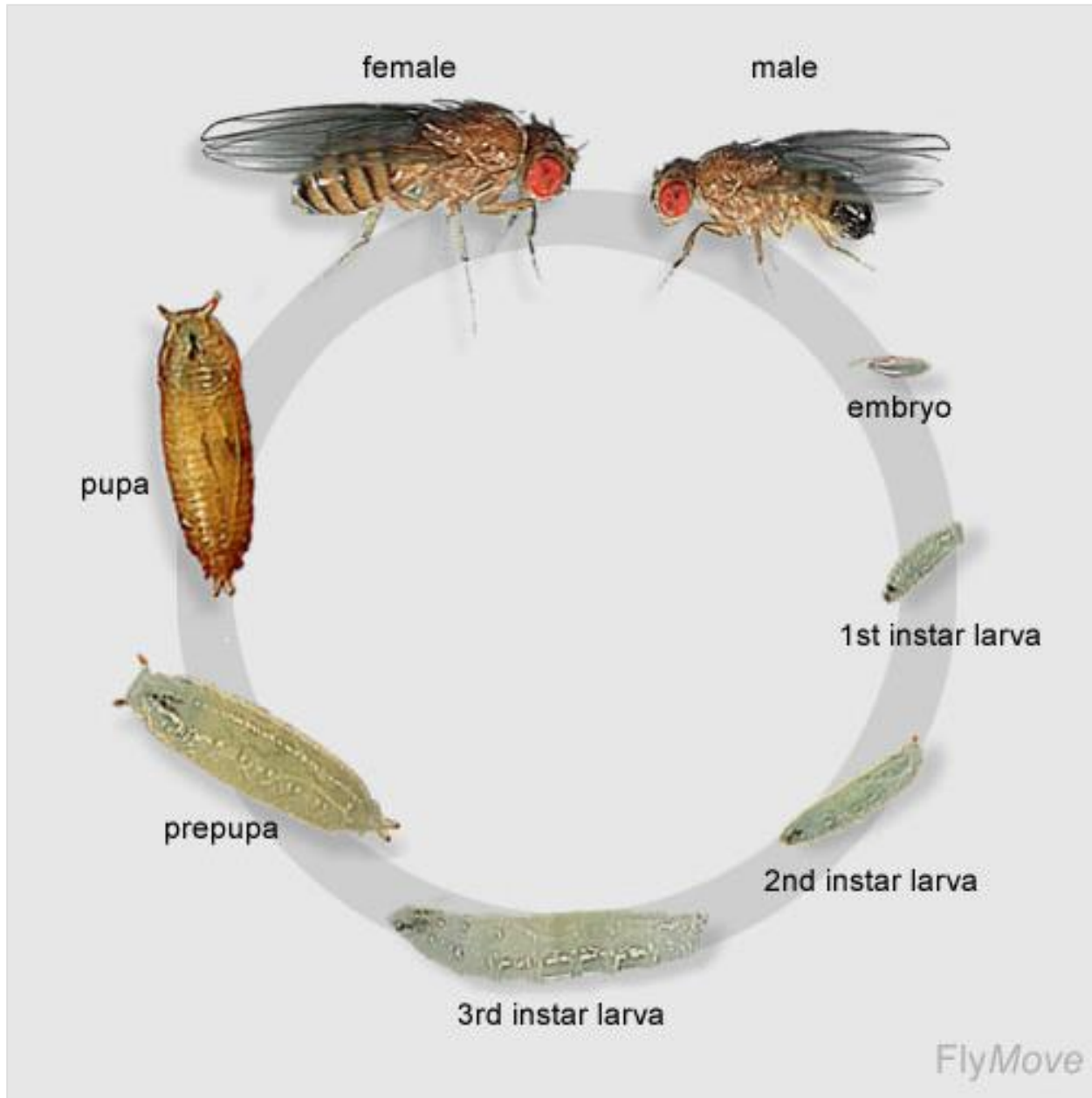
Homologous Recombination



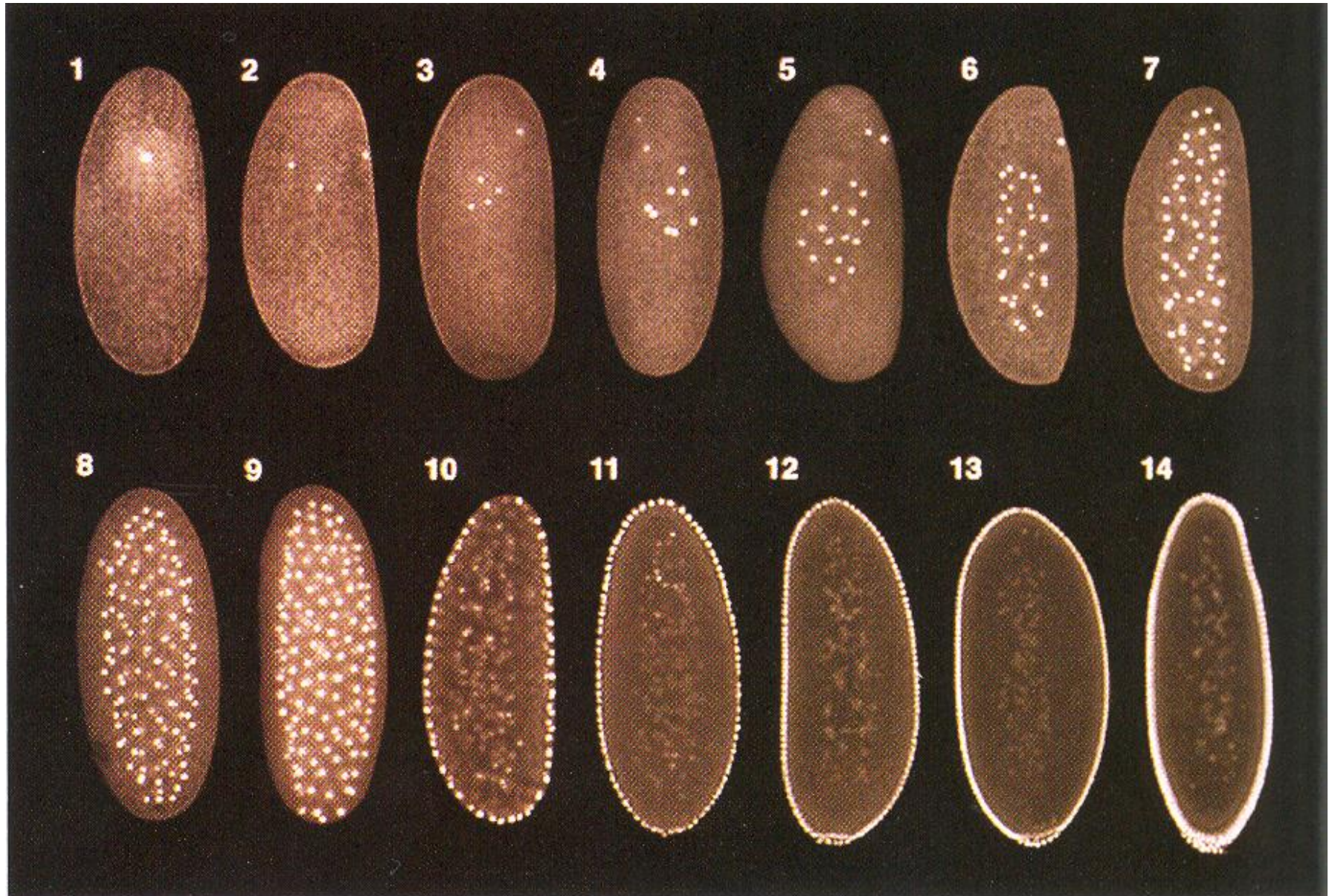
Drosophila melanogaster
(gyümölcslégy – muslica)



A *Drosophila* életciklusa

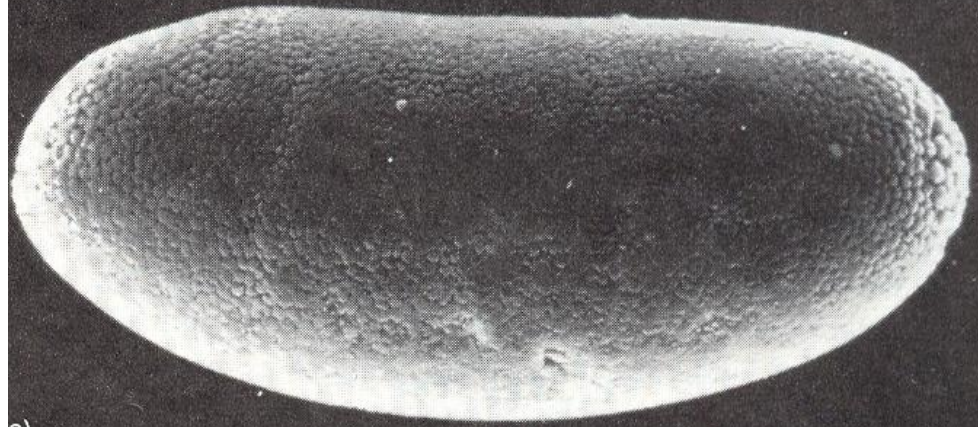


A *Drosophila* embrió korai fejlődése



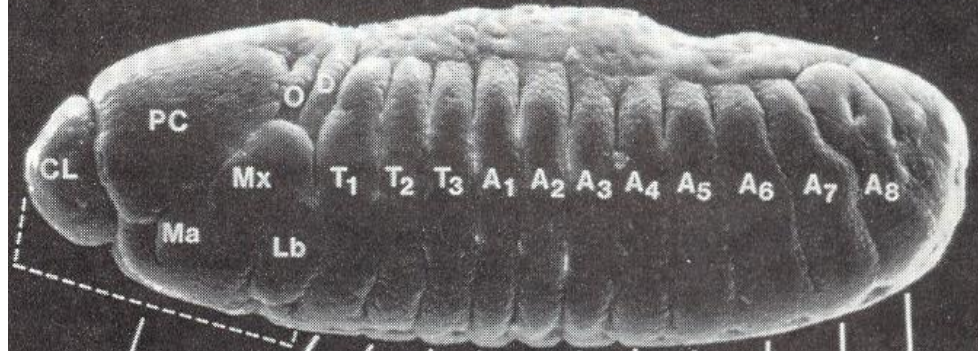
**Szegmentáció és a
sejtek szegment
identitása az
anteroposzterior
tengely mentén korán
kialakul**

**3 óras
embrió**



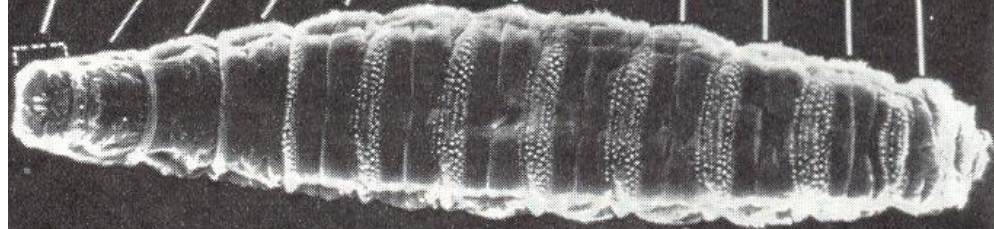
a)

**10 óras
embrió**



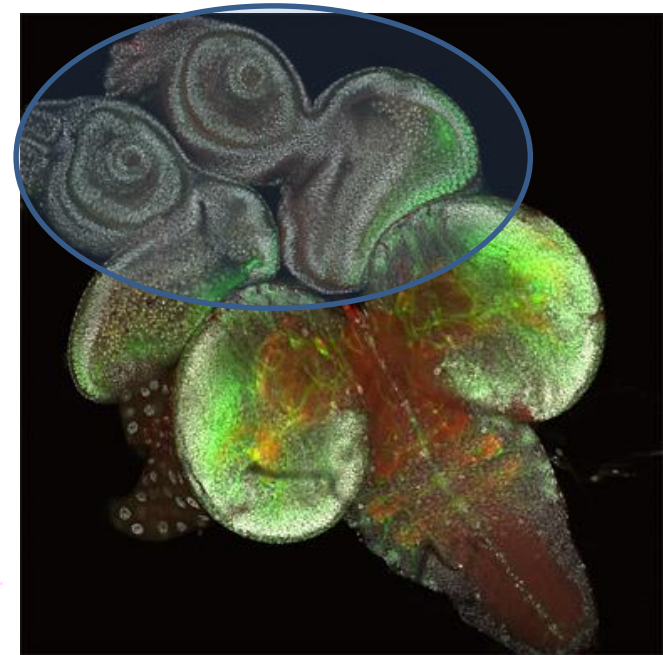
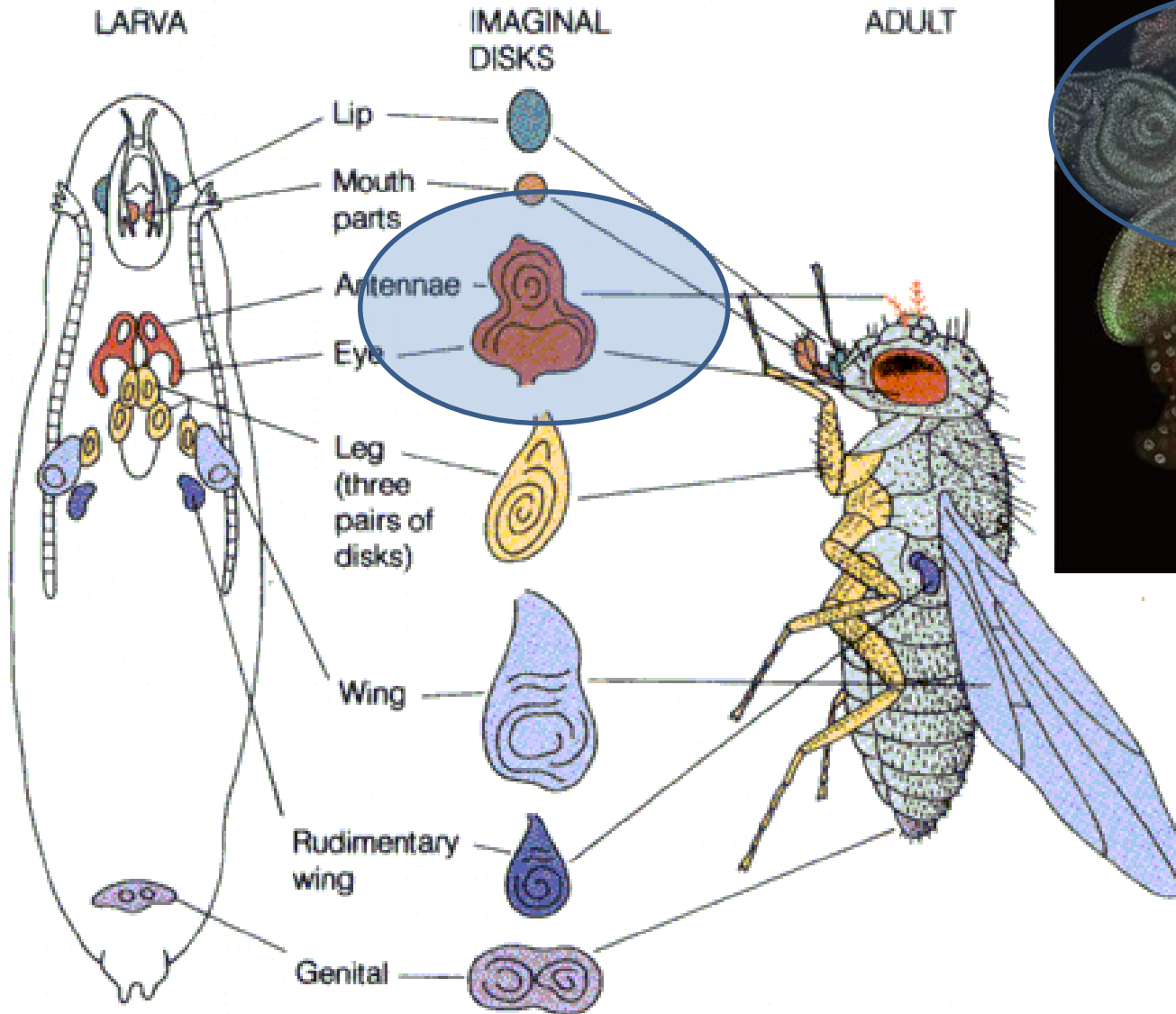
b)

lárva



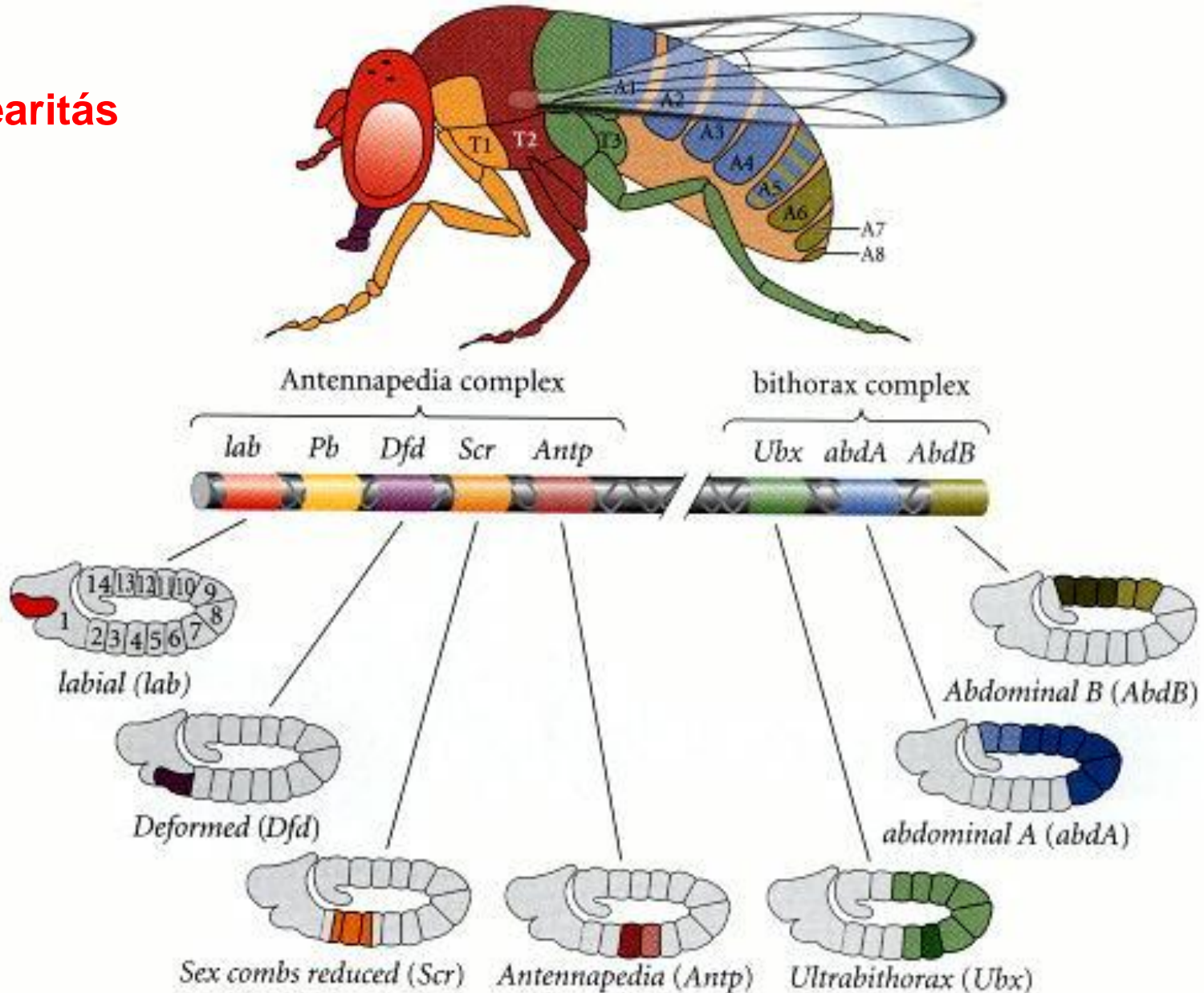
c)

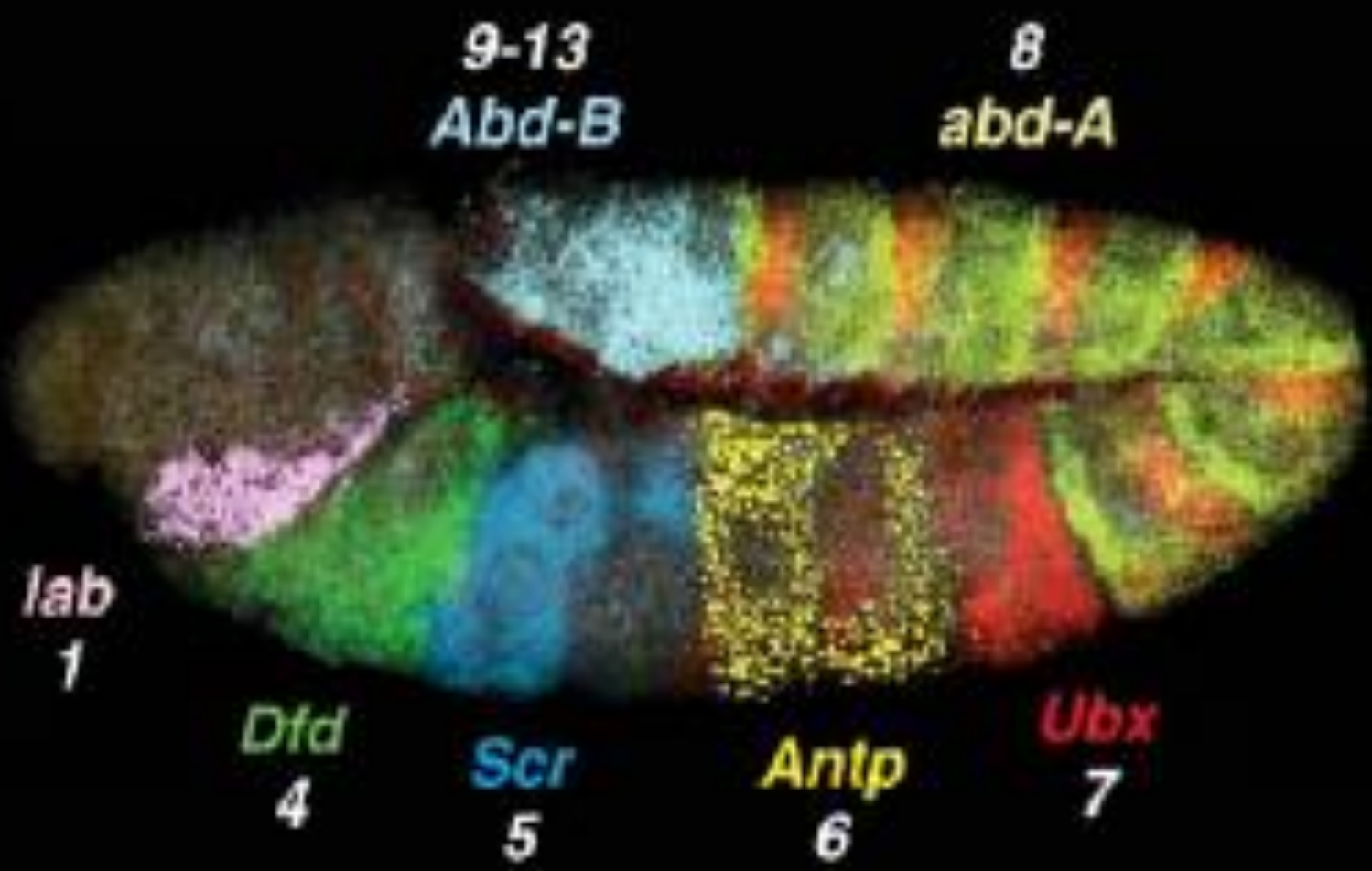
Imaginális diszkuszok



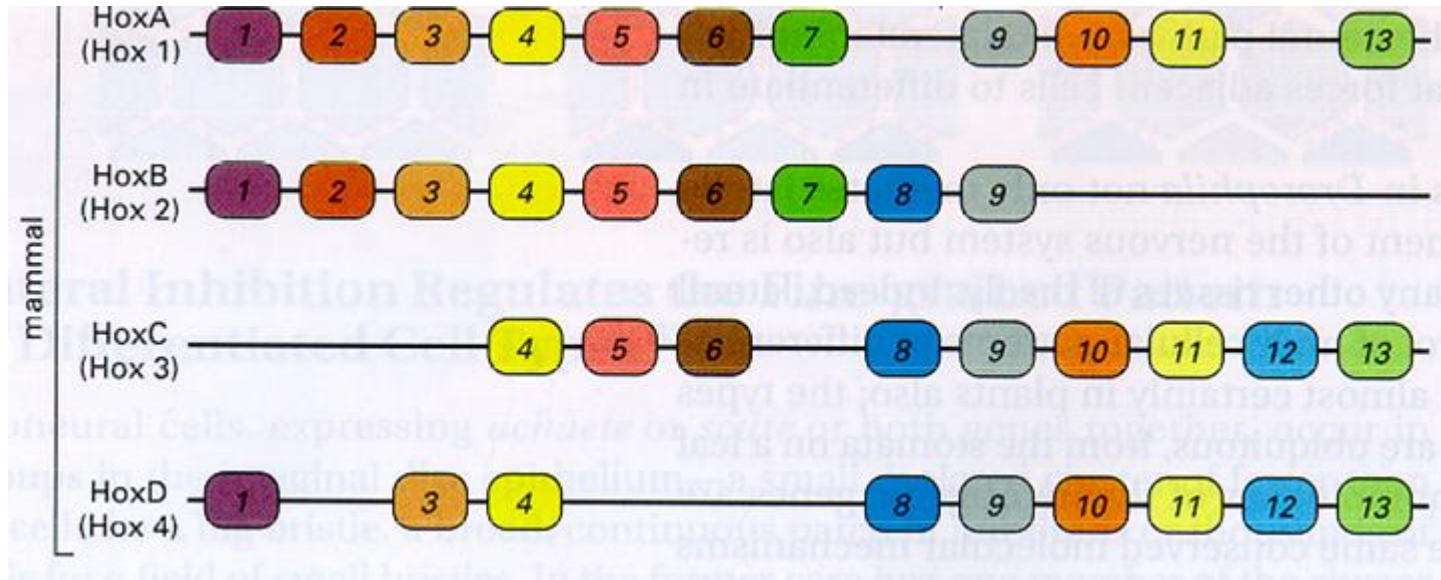
Homeotikus szelektor gének – *Hox* gének

Ko-linearitás

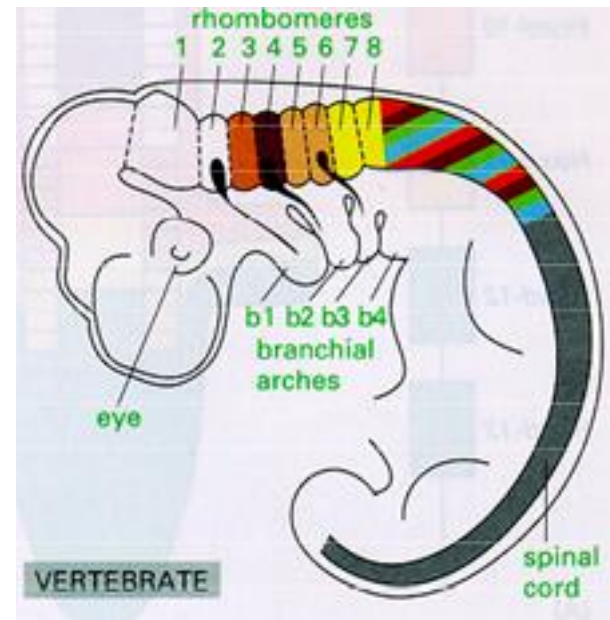




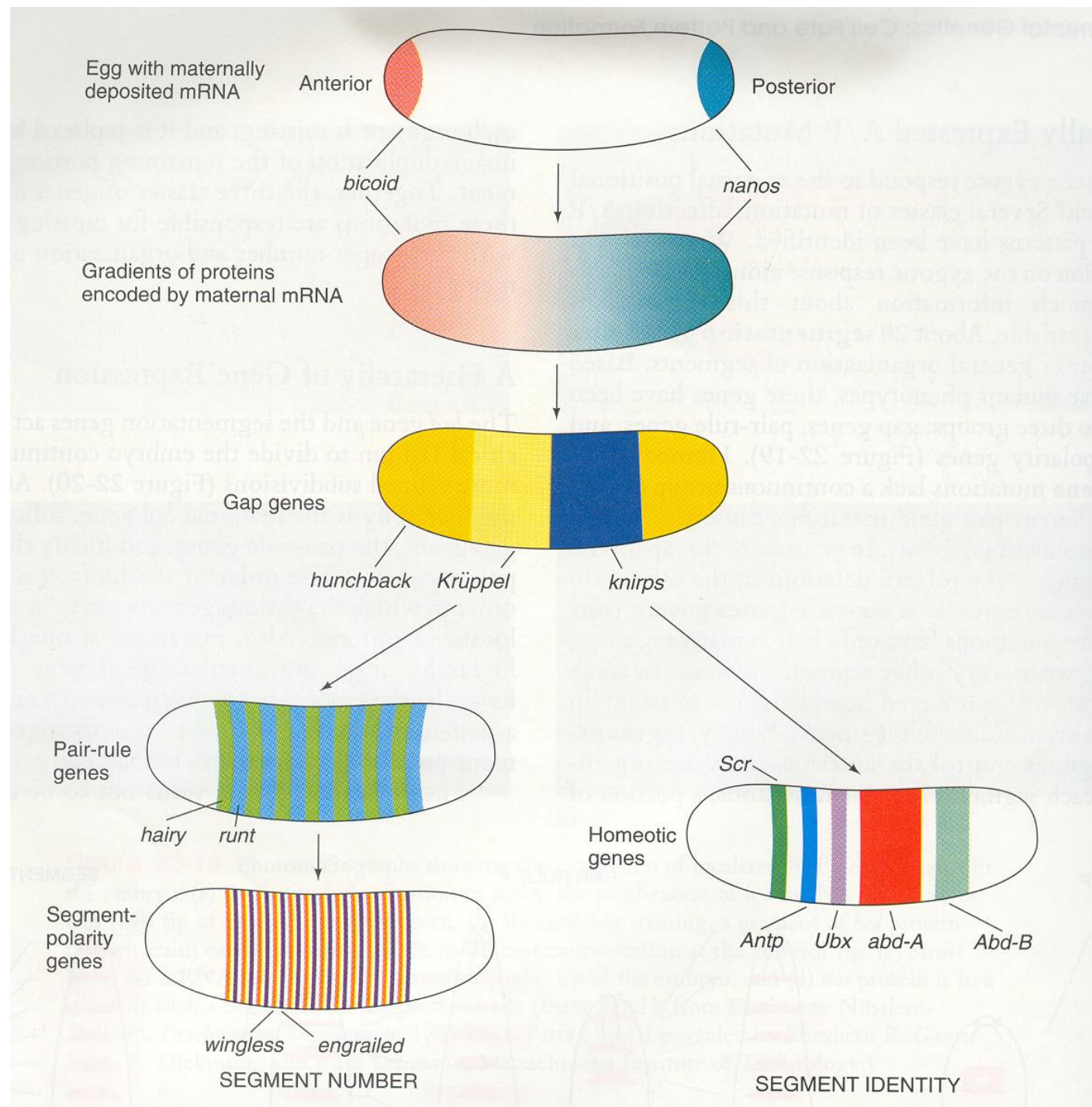
Emlős *Hox* clusterek



- akár külön kromoszómákon
- *Hox* paralógok



Az A/P szegmentációs mintázatot kialakító hierarchikus génkaszád



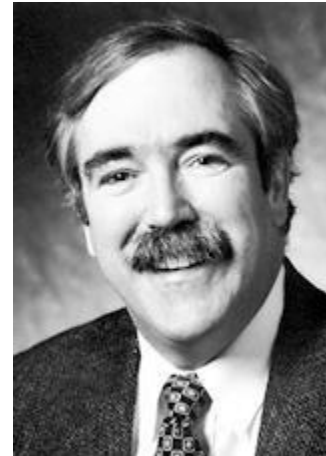
Korai embrionális fejlődés



Ed Lewis

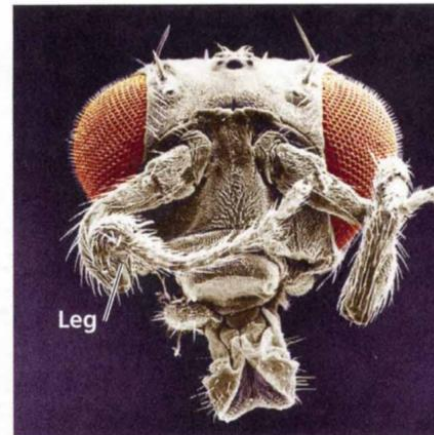
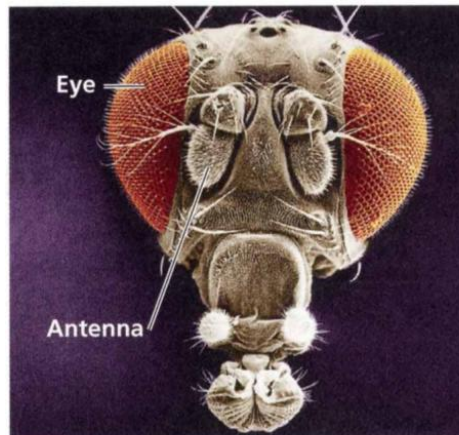


Christiane
Nüsslein-Volhard

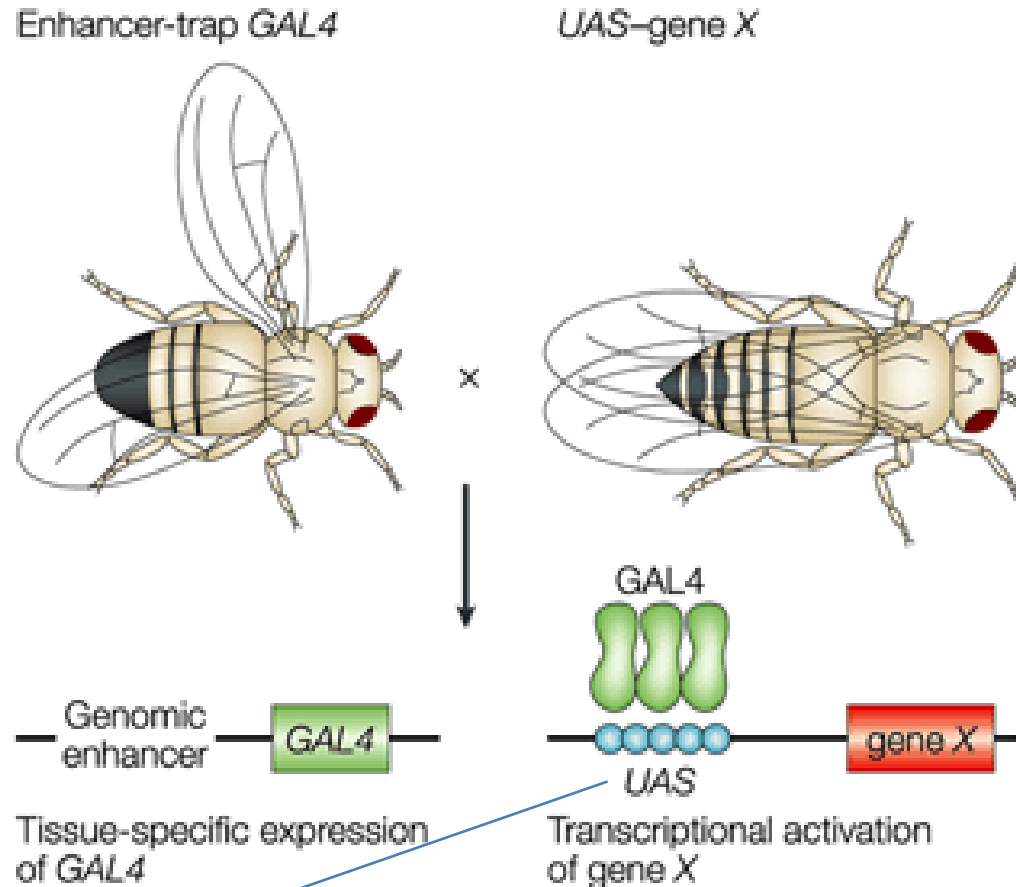


Eric Wieschaus

1995 Nobel díj: A korai embrionális fejlődés genetikája

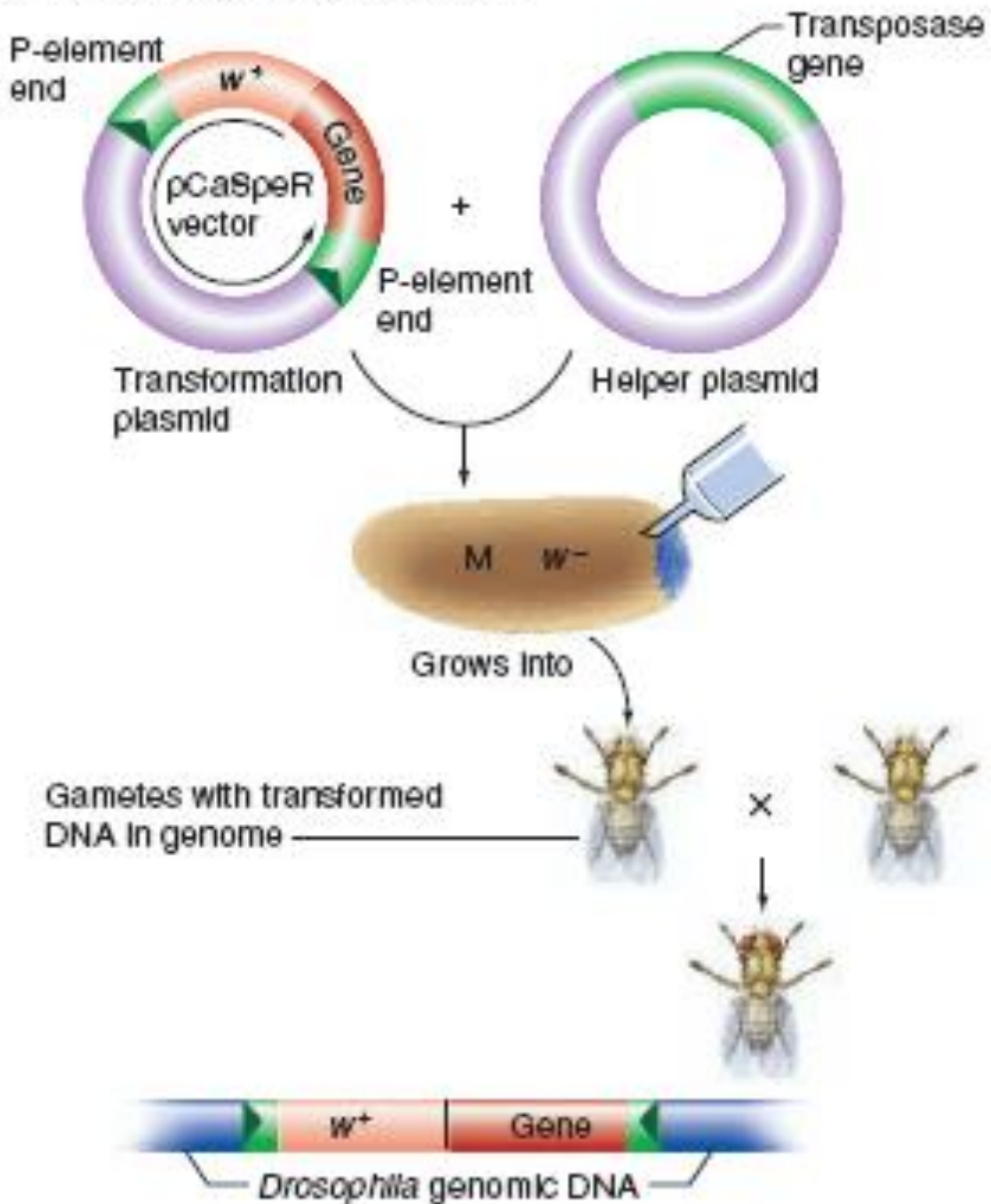


Gal4-UAS rendszer Drosophilában



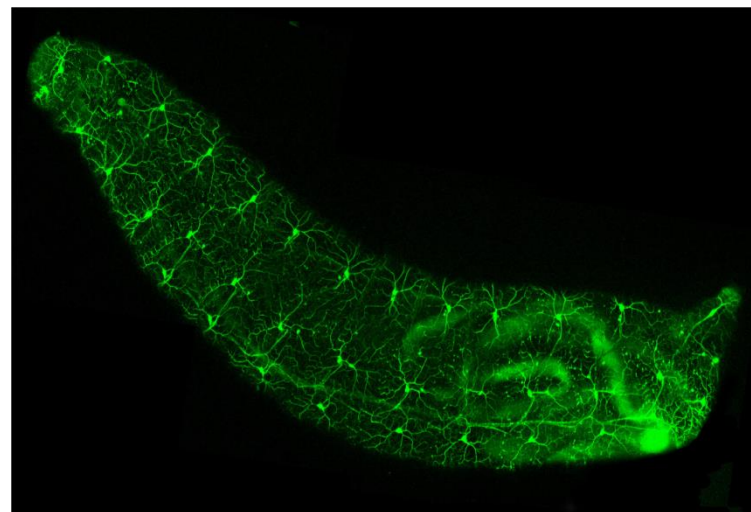
Saját (endogén) promóter általában nem működik Drosophilában (*C. elegans*-ban viszont remekül): genomi környezet fontossága.

(a) Transformation of *Drosophila*



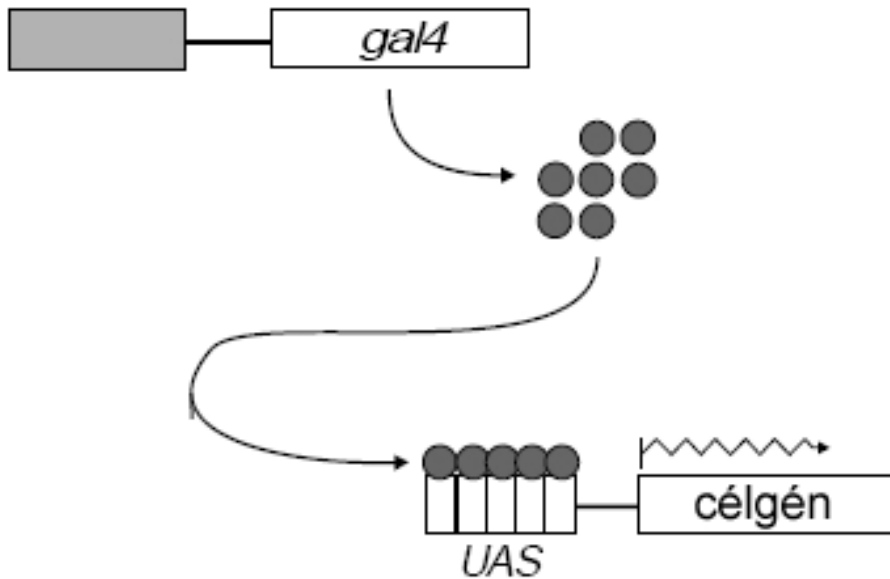
Transzformáció

érzőneuronok lárvában



UAS-Gal4 rendszer

genomikus/
klónozott
promóter

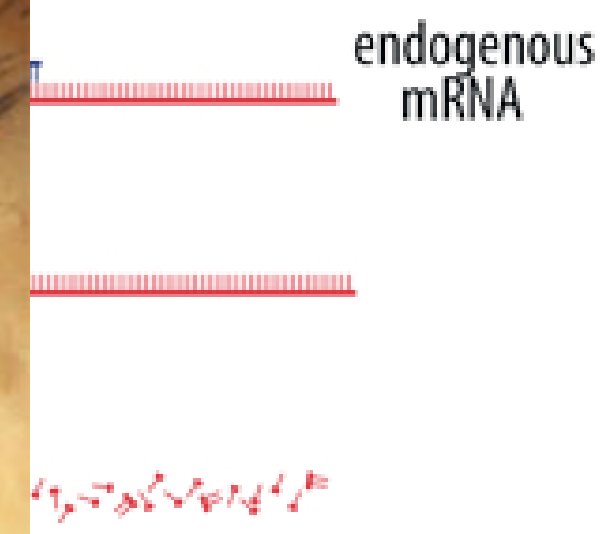
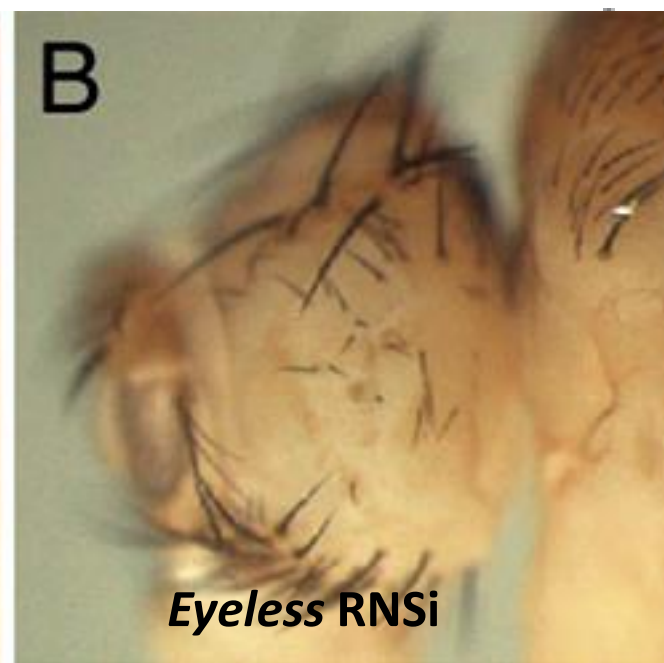
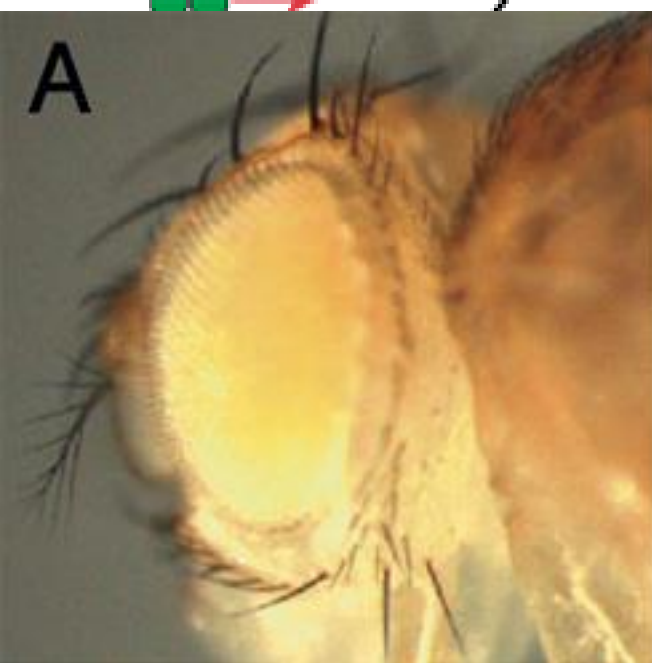
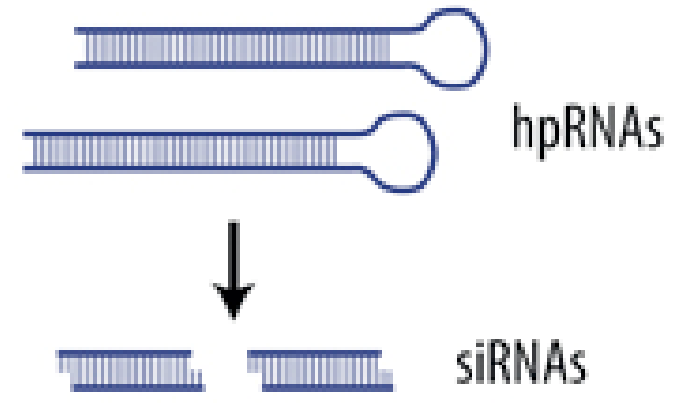
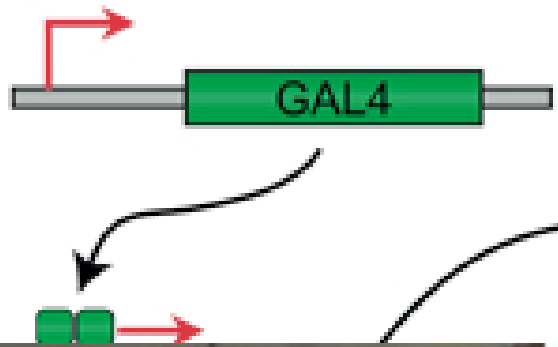


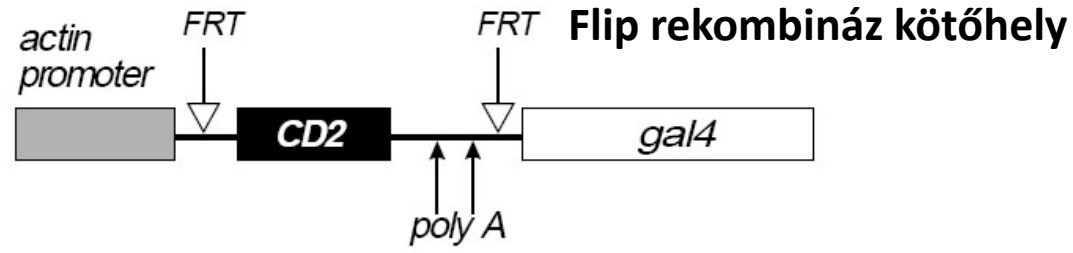
dpp-Gal4, UAS-eyeless

Gal4 élesztő transzkripció faktor, ami a megfelelő DNS-szekvenciához köt a célgén promóterében (UAS – *upstream activating sequence*), és elindítja a génexpressziót.

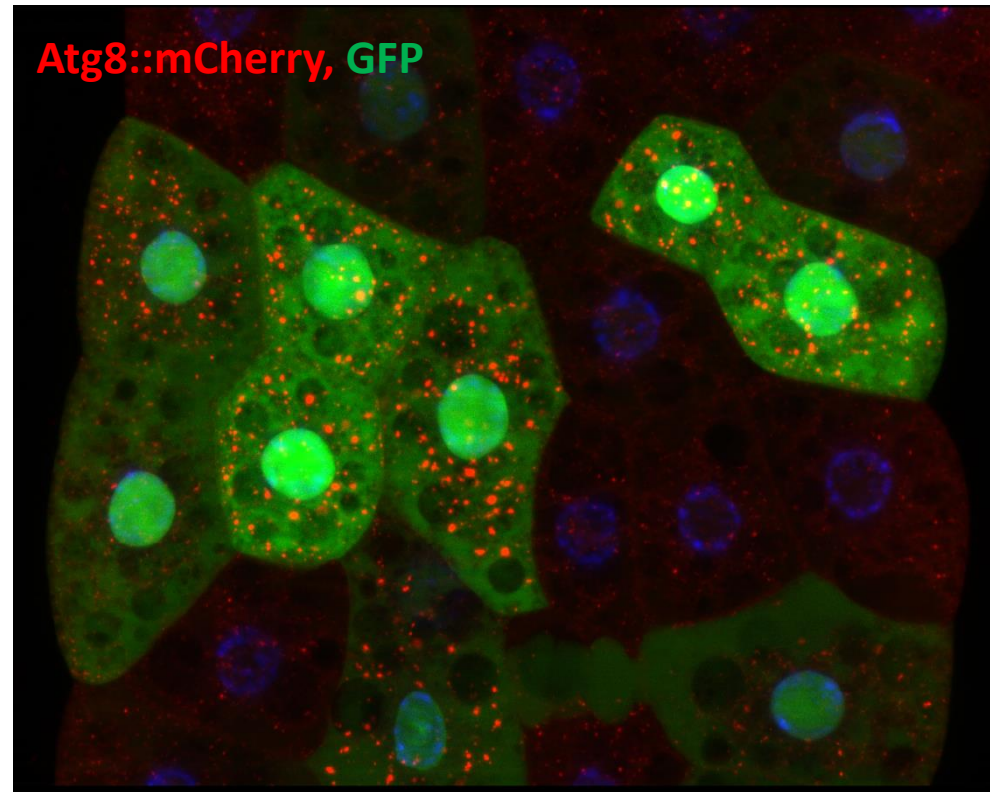
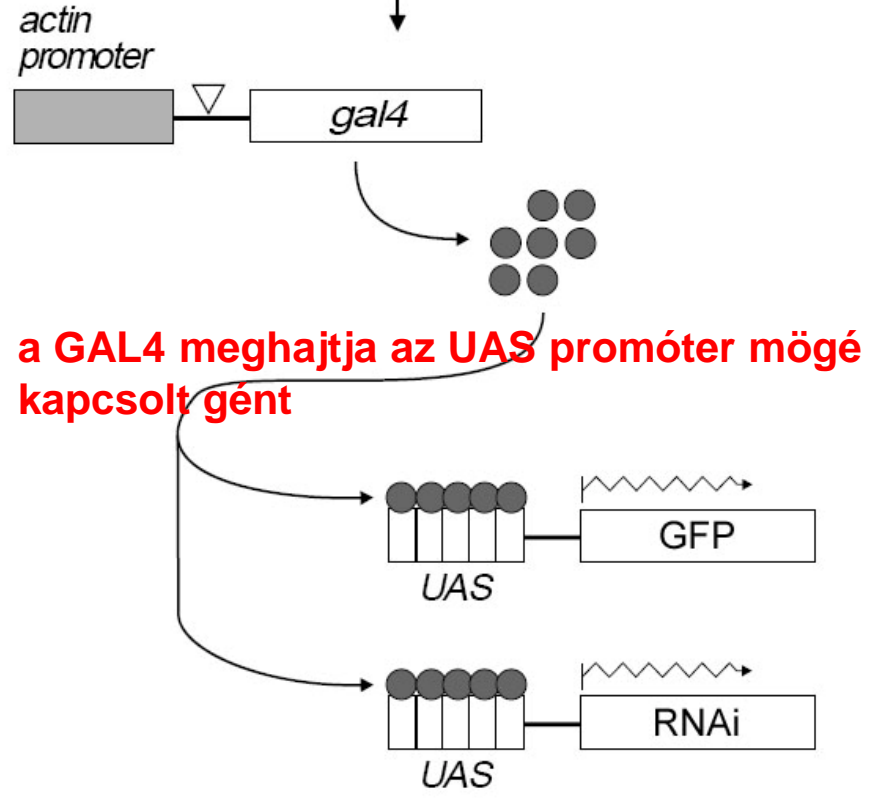
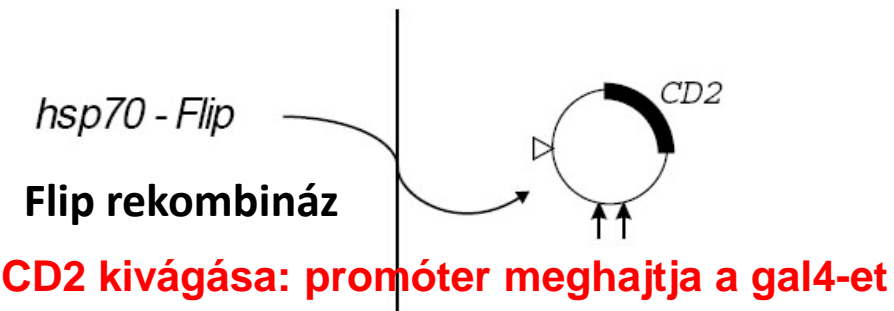
In vivo UAS-RNSi könyvtárak

tissue-, cell-, or stage-specific promoter

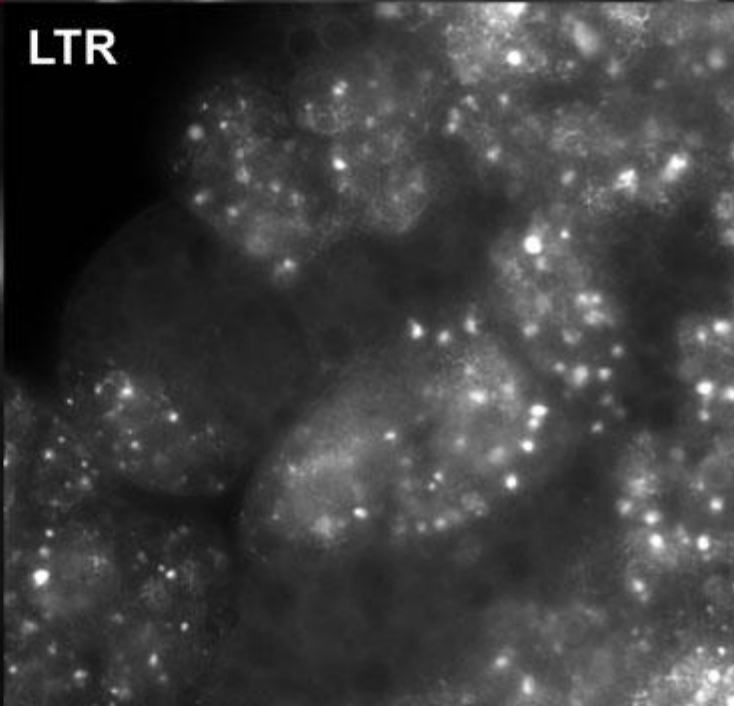
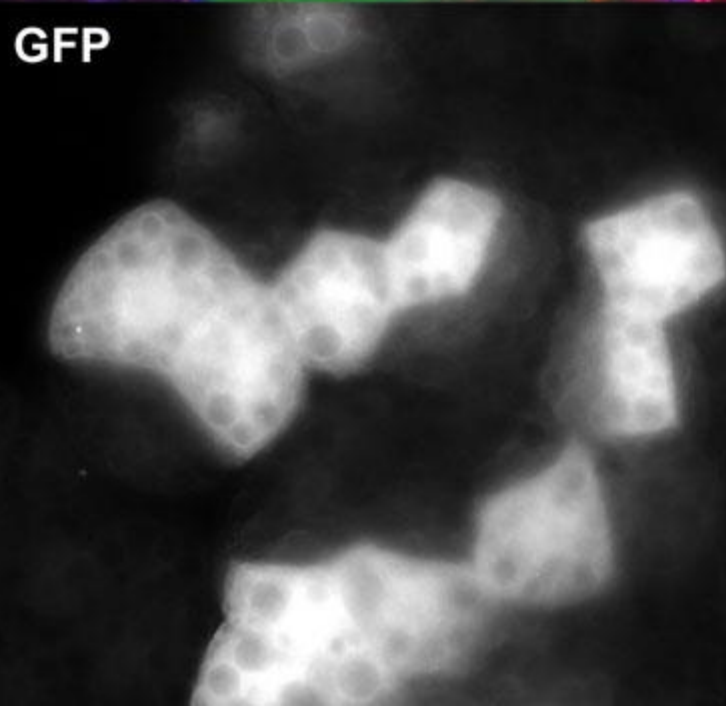
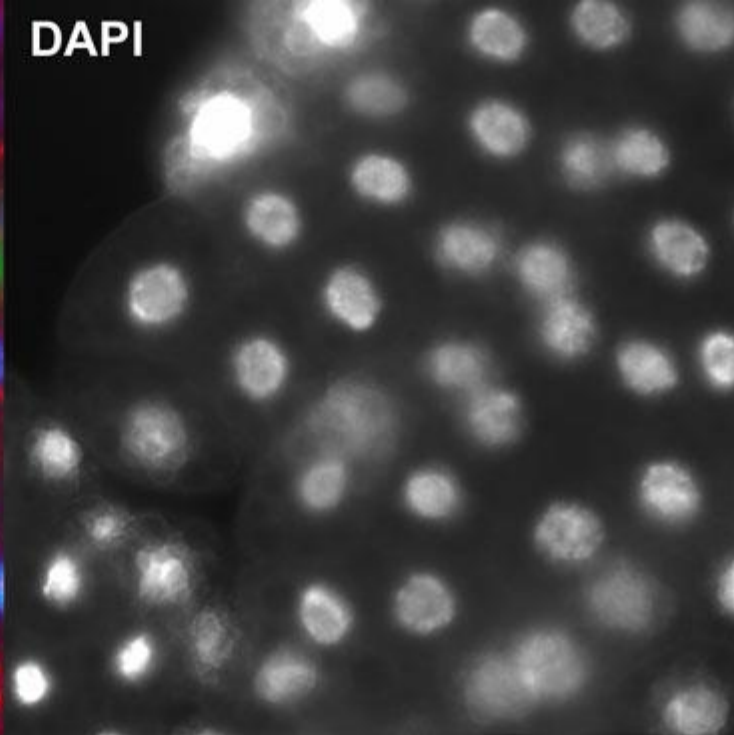
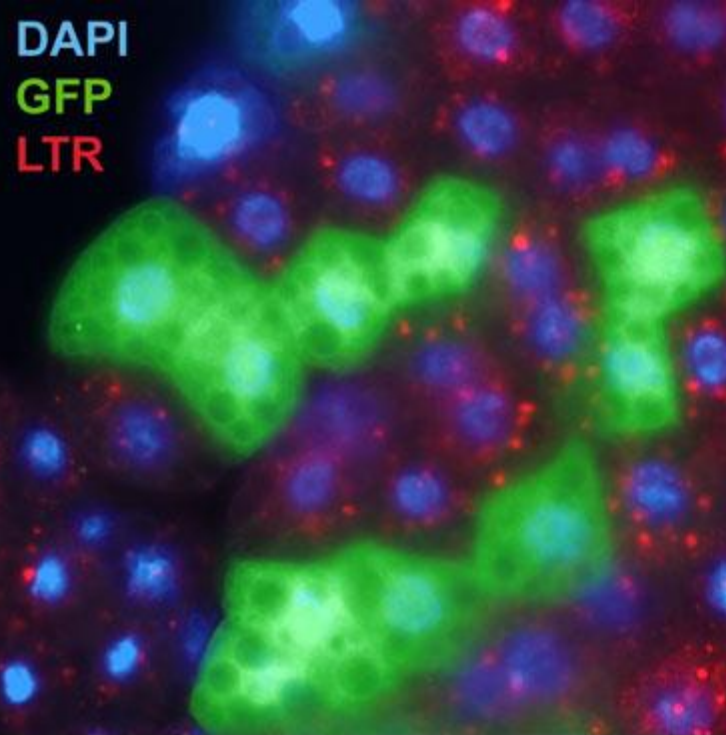




Szomatikus klónok

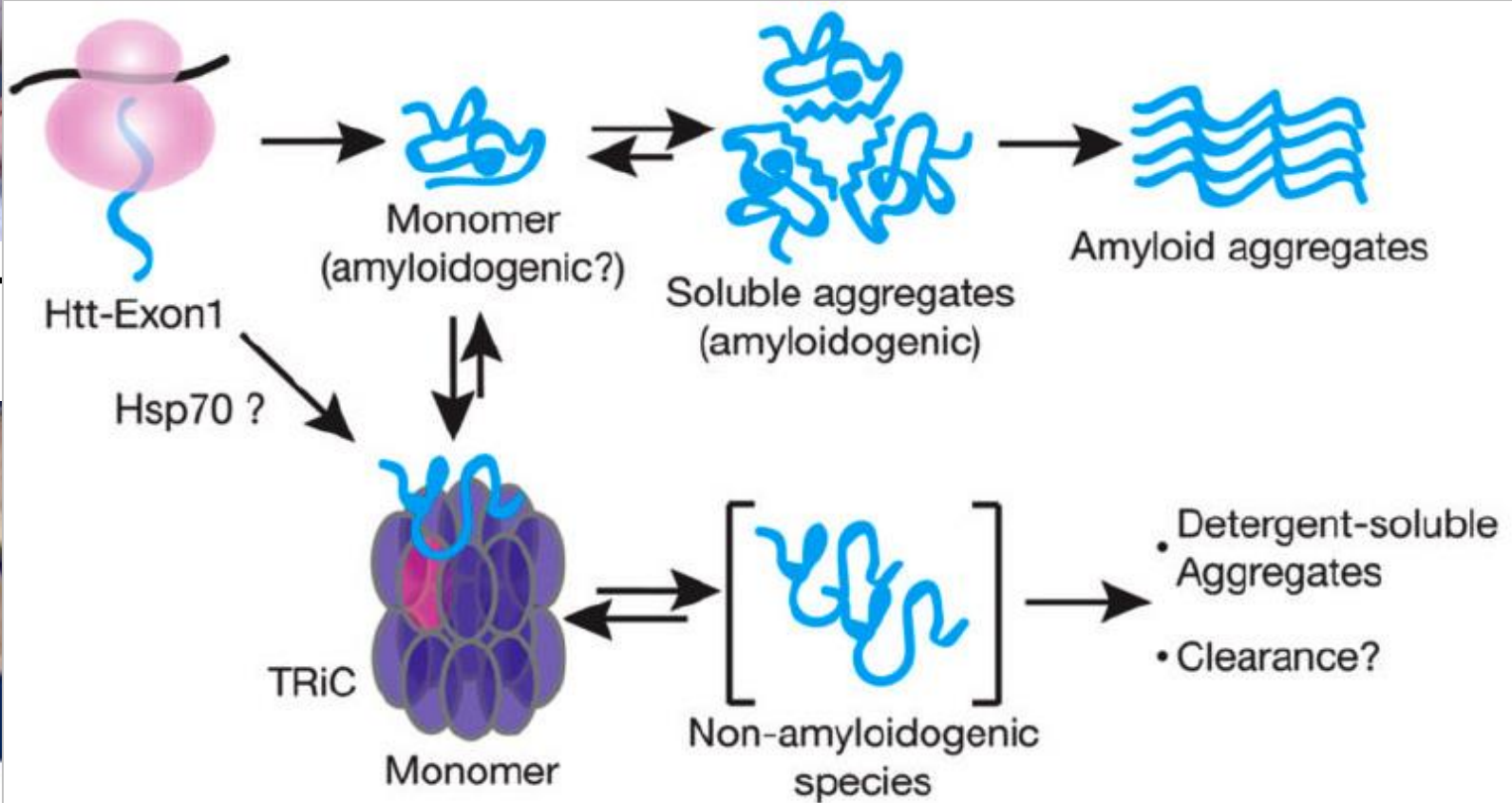


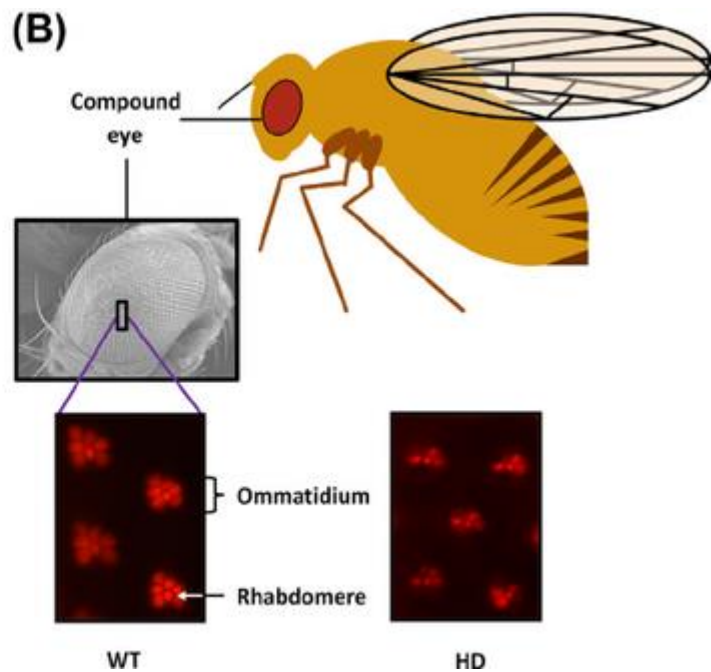
Amelyik sejt zöld, abban van kikapcsolva egy adott gén. Kontroll az identikus szöveti környezet.



Atg2 RNSi

Transzgénikus *Drosophila* – egy példa

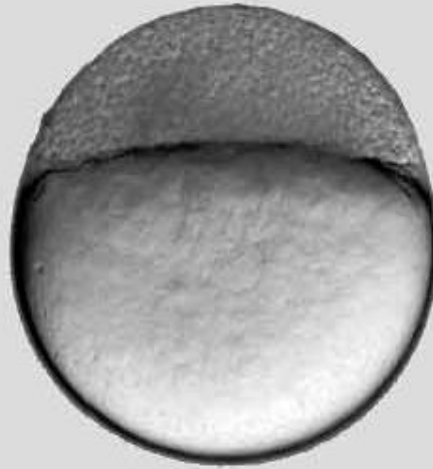


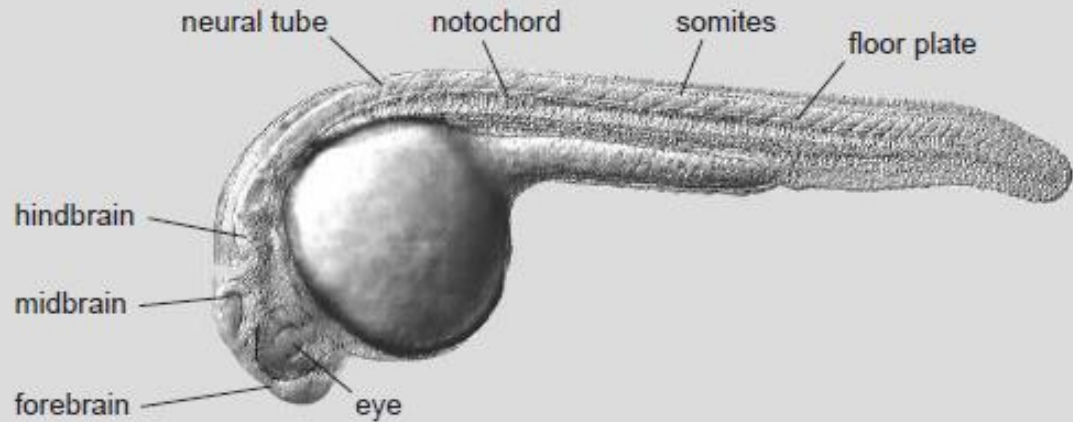


Zebrahal (*Danio rerio*)



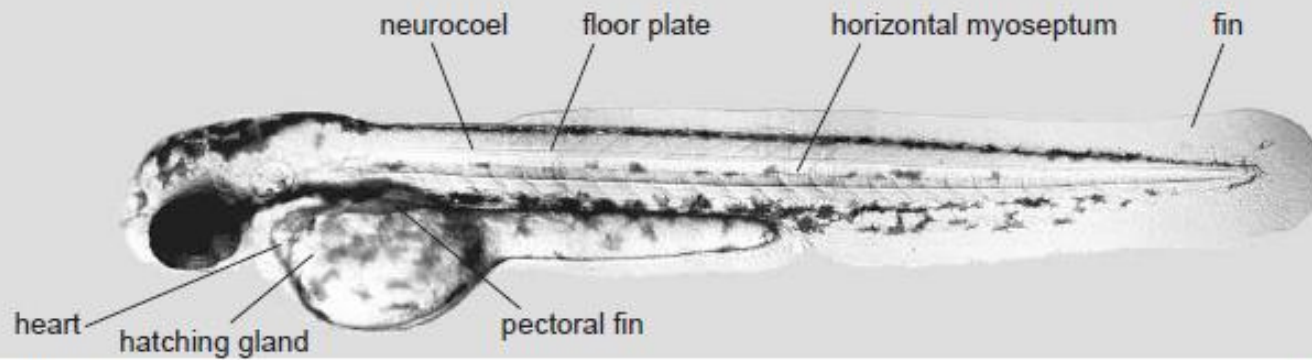
Korai egyedfejlődés





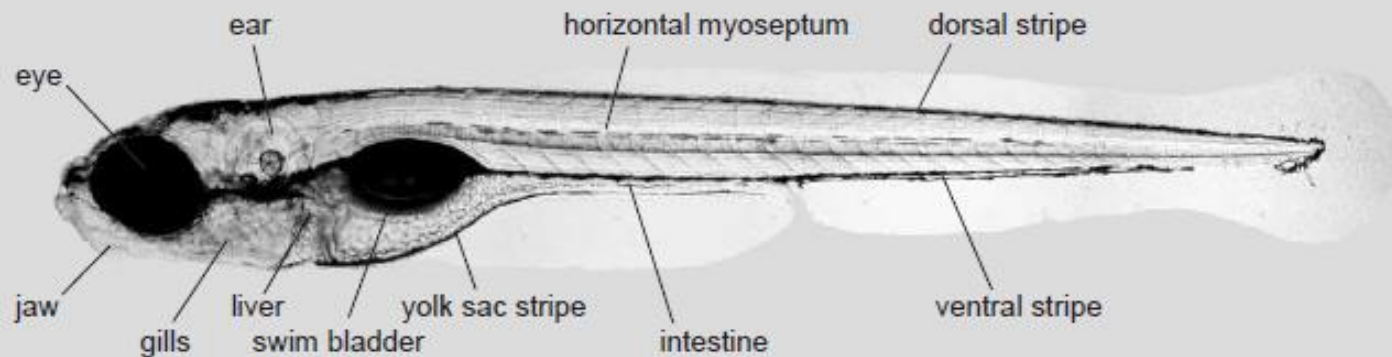
pharyngula period

29 h



hatching period

48 h



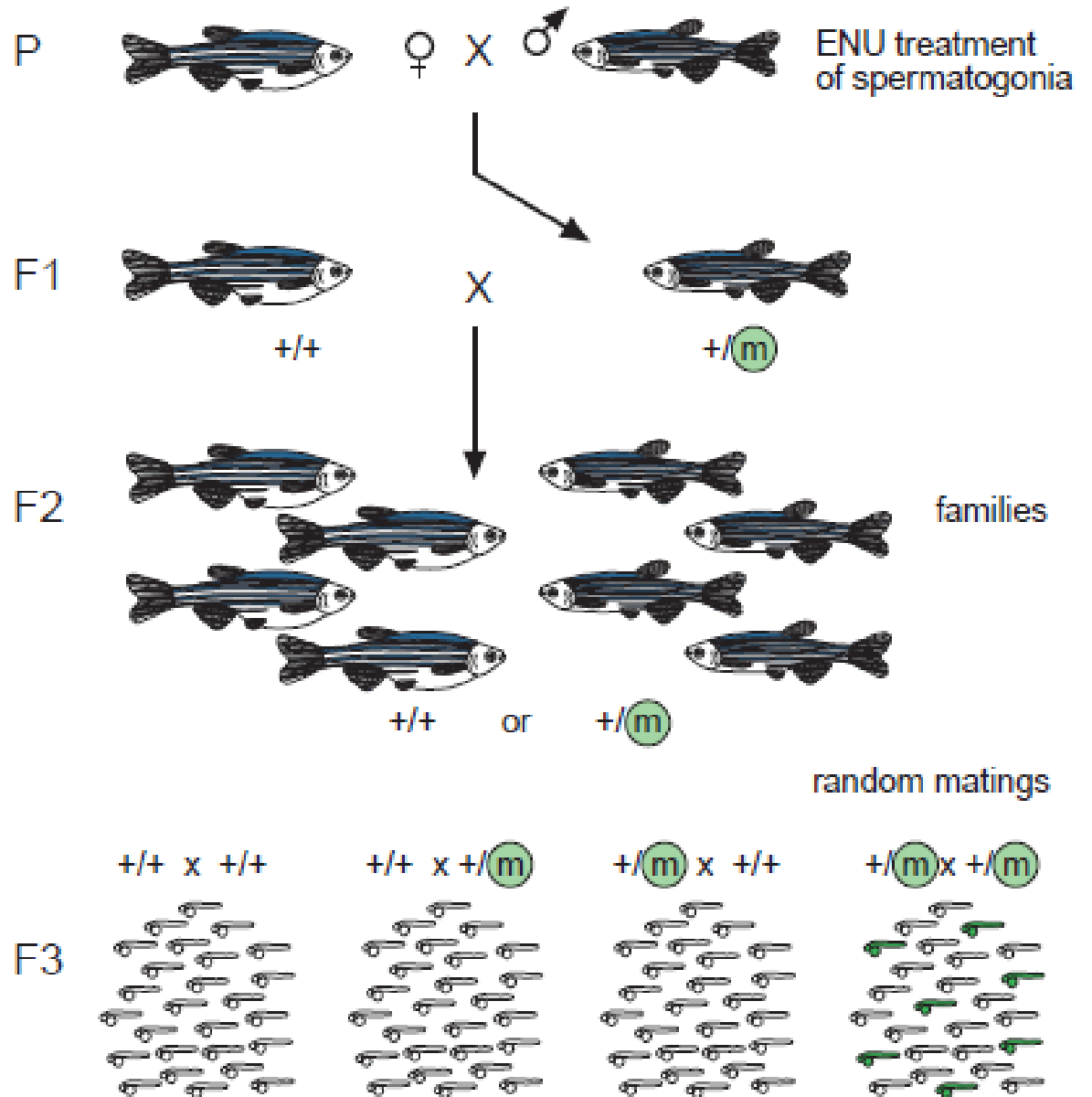
swimming larva

5 d

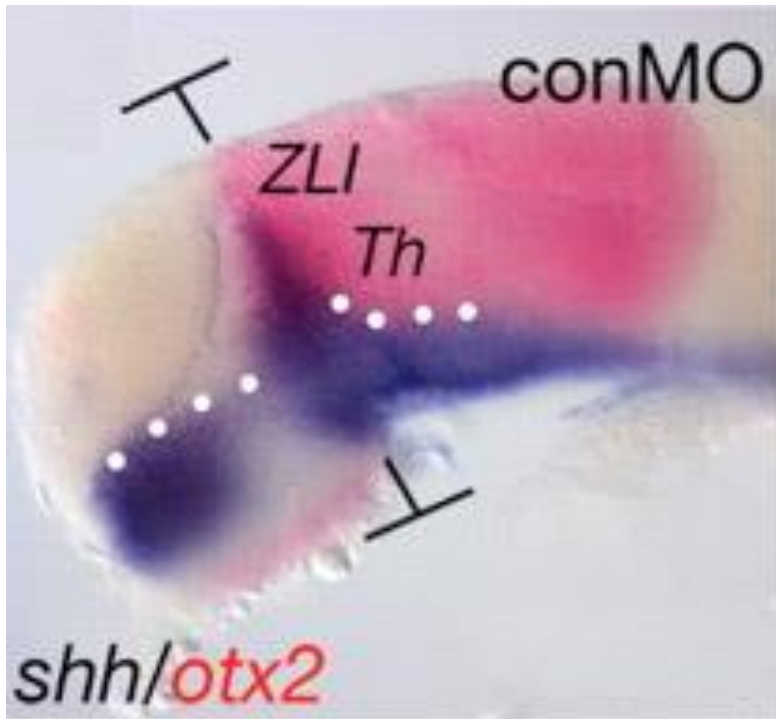
“A trópusi, édesvízi zebrahalat, a Brachydanio rerio-t, számos előnyös tulajdonsága miatt választottuk: a generációs ideje mindössze 3-4 hónap; a felnőtt nőstények heti rendszerességgel több száz ikrát raknak, amelyek gyorsan és szinkronban fejlődnek az anyán kívül; a hal kicsi (3 cm), szívós és könnyen tartható. A 7 napos, szabadon úszó halak mindössze néhány milliméter hosszúak, de már a kifejlett egyedek számos morfológiai és viselkedési bélyegét mutatják. Mindez lehetővé teszi a mutációk nagy léptékű szűrését. Mivel a normális fejlődés 25-31°C között zajlik, lehetőség nyílik hőmérséklet-érzékeny mutációk izolálására is.”

Nature (1981) 291: 293-296.

Keresztezési stratégia



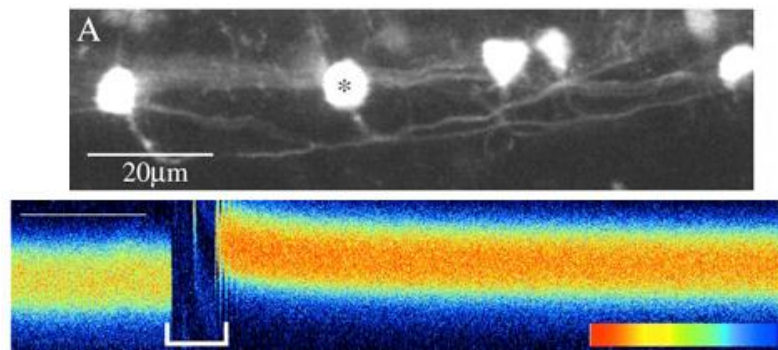
Átlátszó



In situ hibridizáció

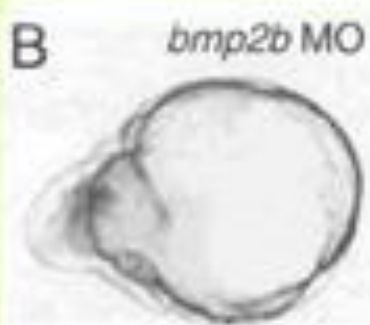
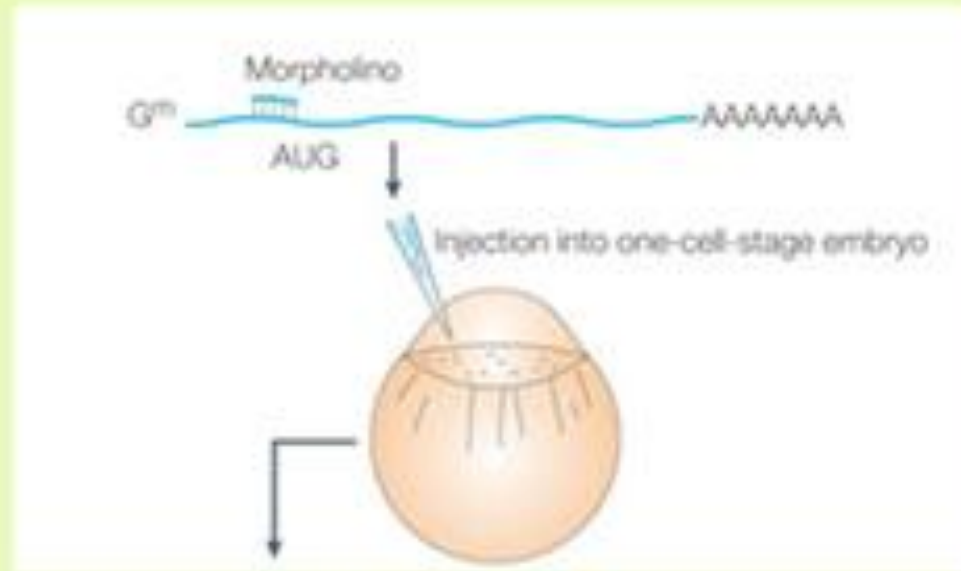


Fluoreszcens immunfestés



Idegsejt-aktivitás
detektálása *in vivo* Ca²⁺
szenzitív festékekkel

Géncsendesítés - morfolino



morpholino

Vivo morpholino

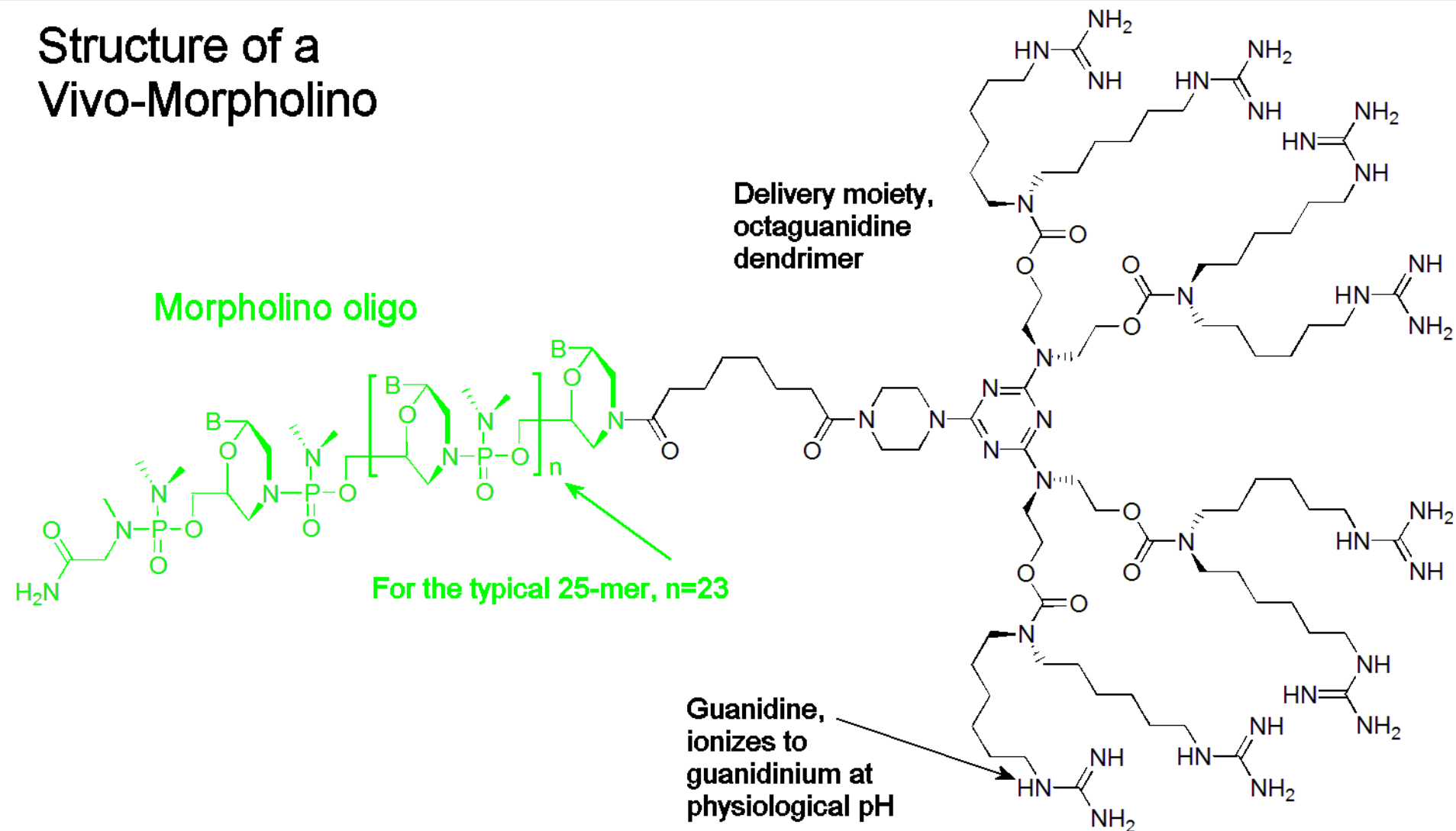
Structure of a Vivo-Morpholino

Morpholino oligo

Delivery moiety,
octaguanidine
dendrimer

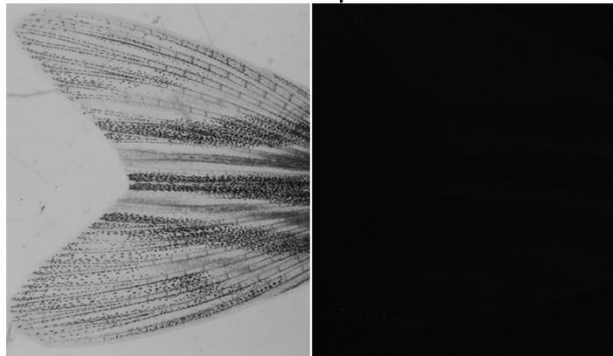
For the typical 25-mer, $n=23$

Guanidine,
ionizes to
guanidinium at
physiological pH

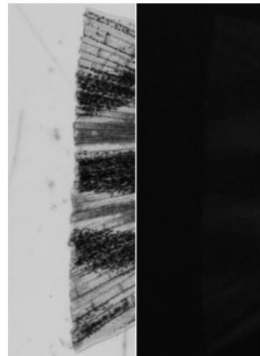


Regenerációs modell

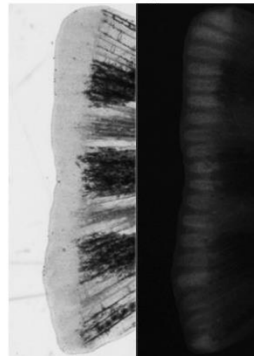
before amputation



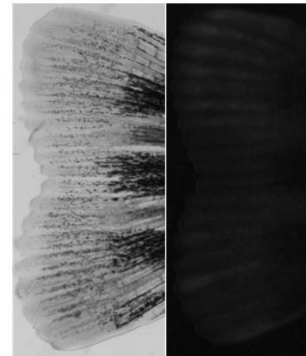
0 dpa



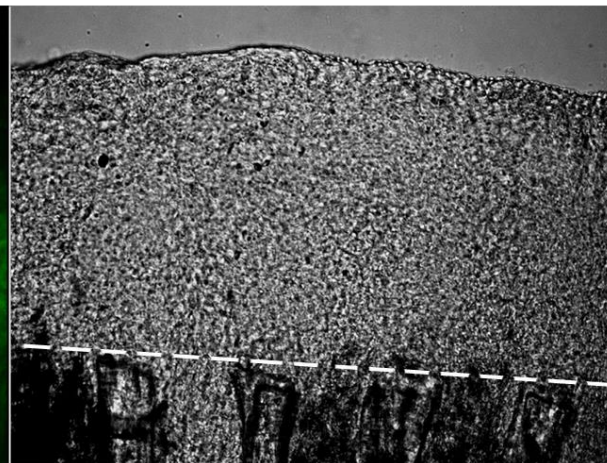
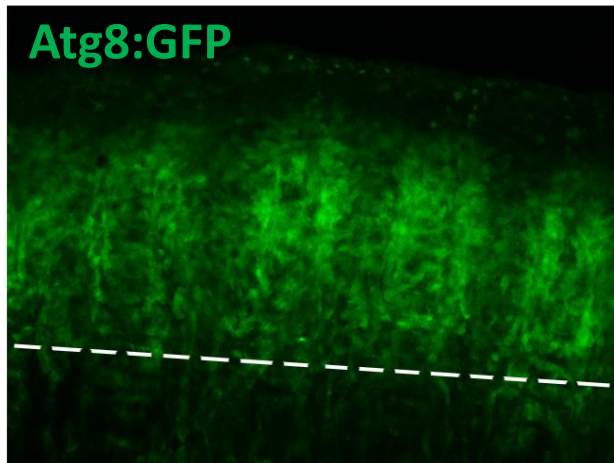
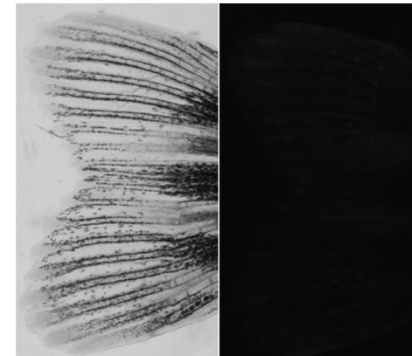
2 dpa



4 dpa

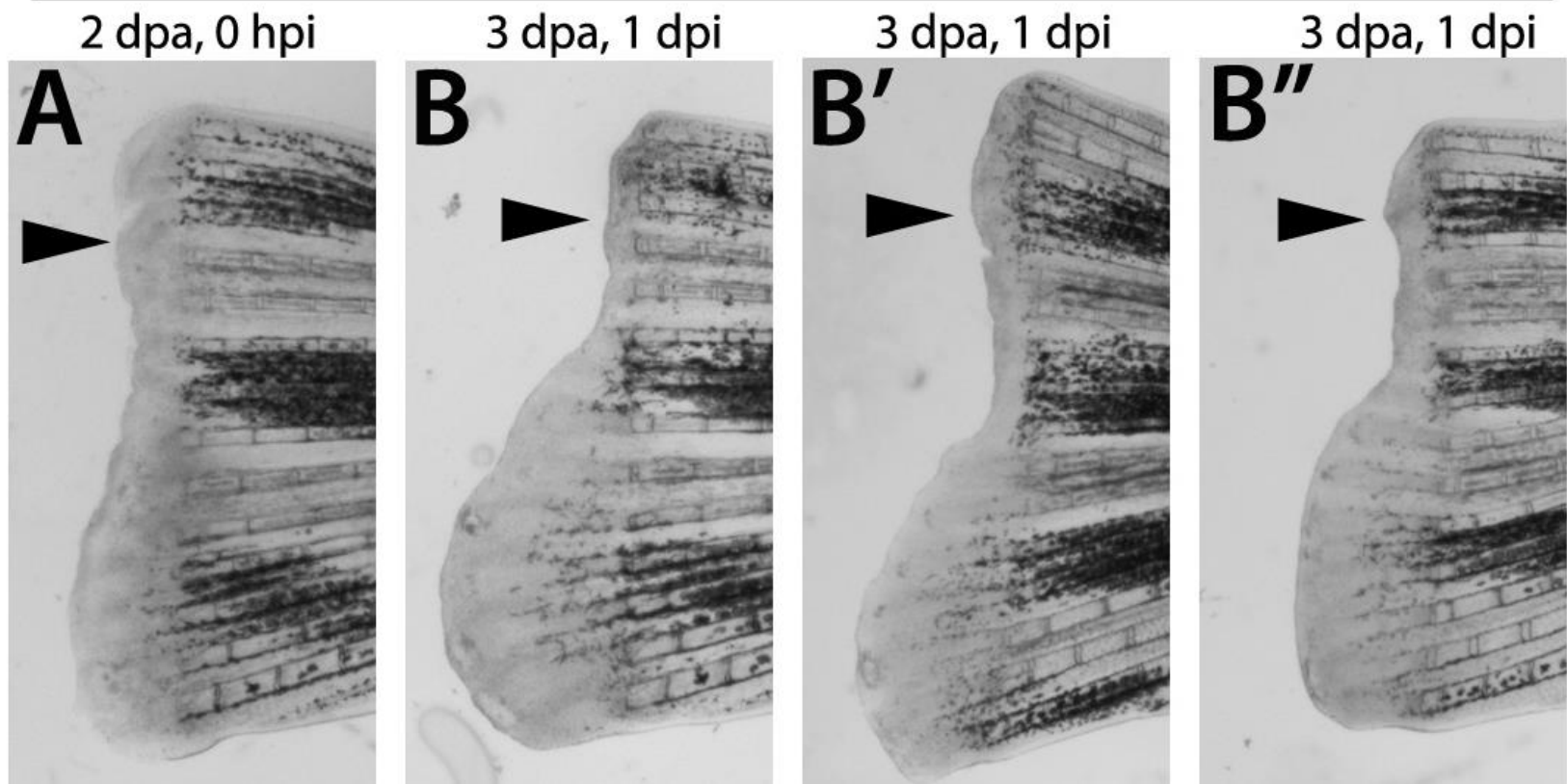


6 dpa

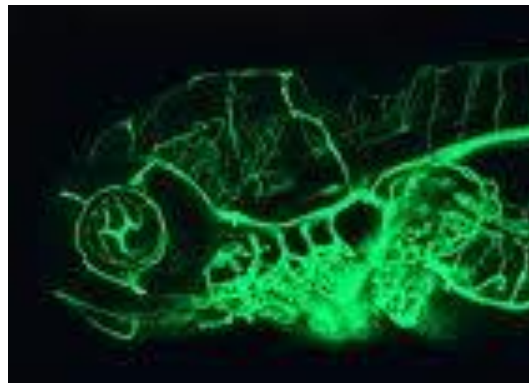
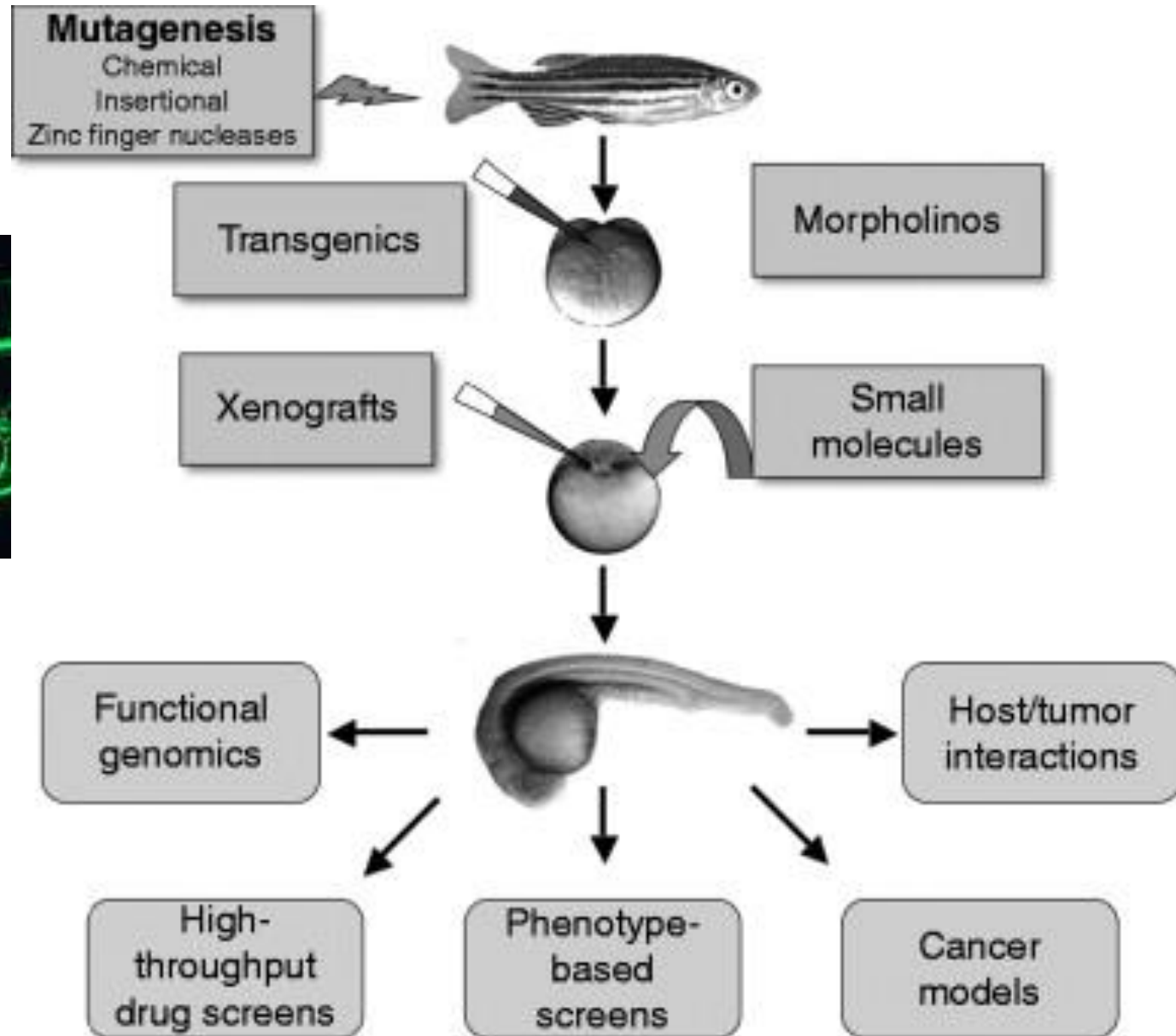


Regenerációs modell

Atg5MO



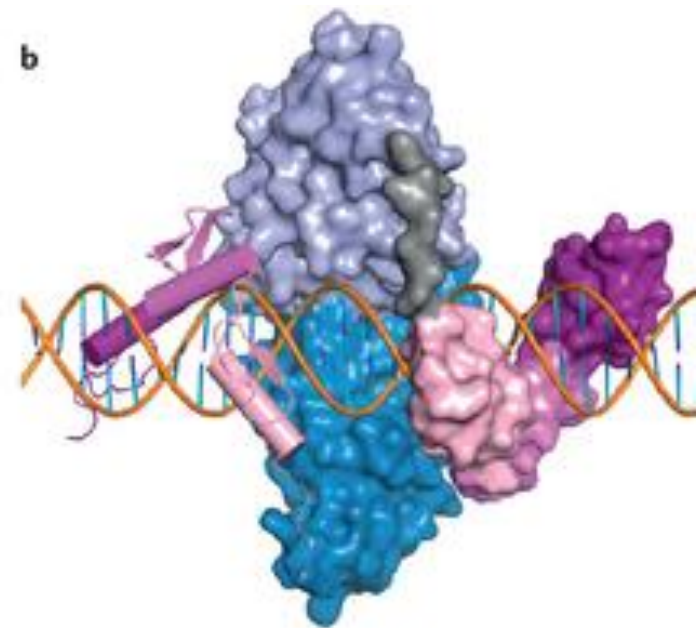
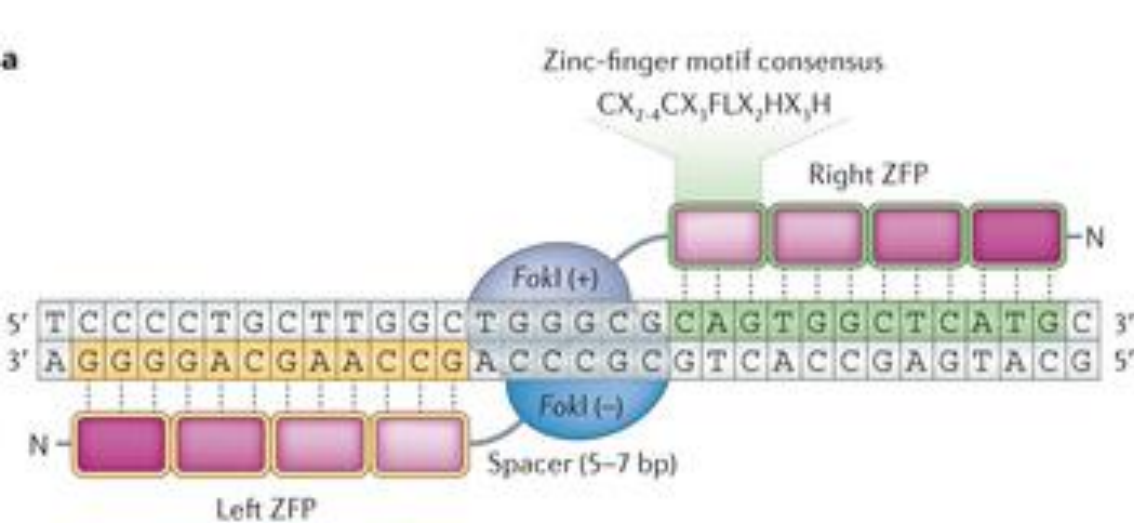
Expressziós analízis

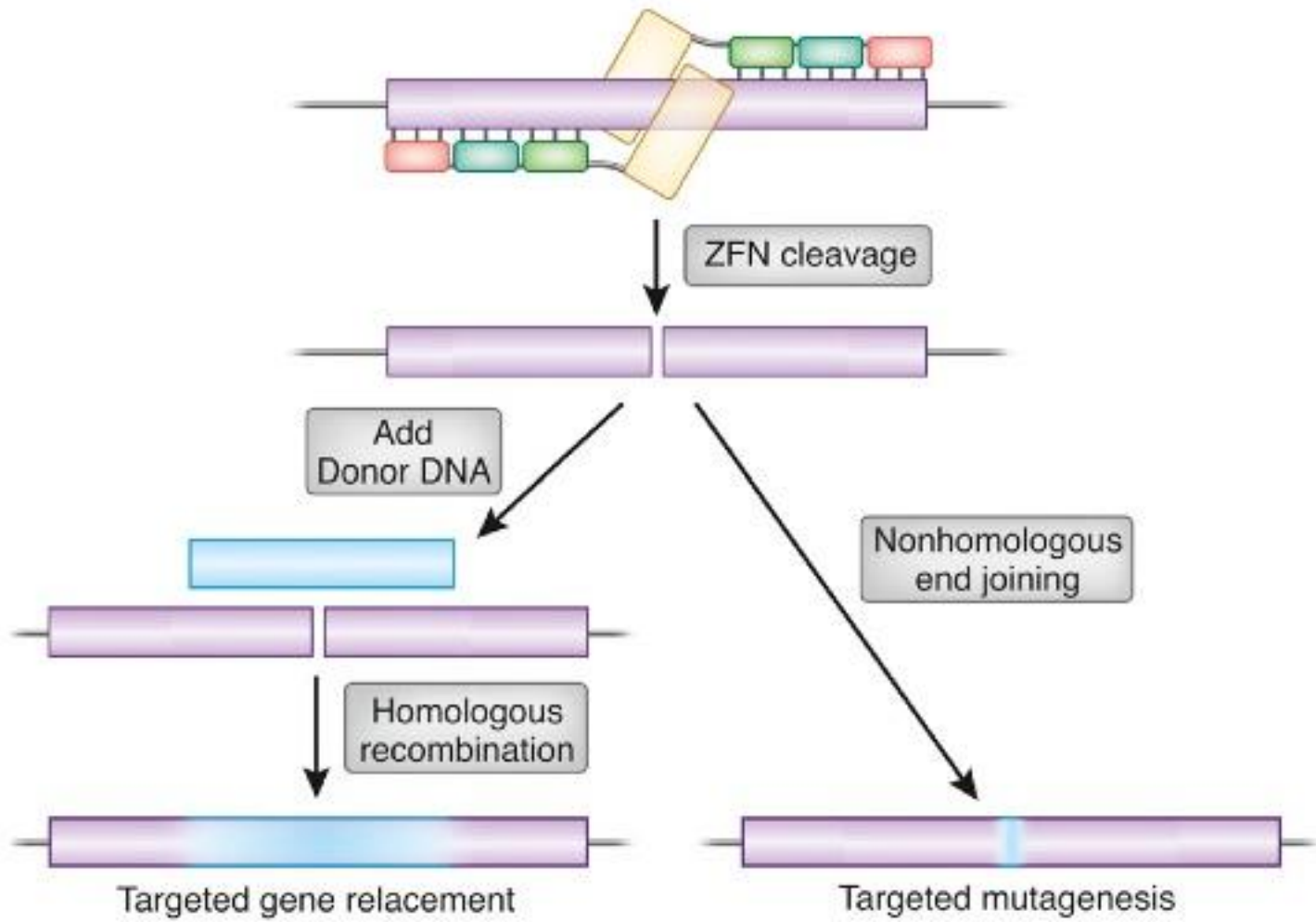


Programmable nucleases

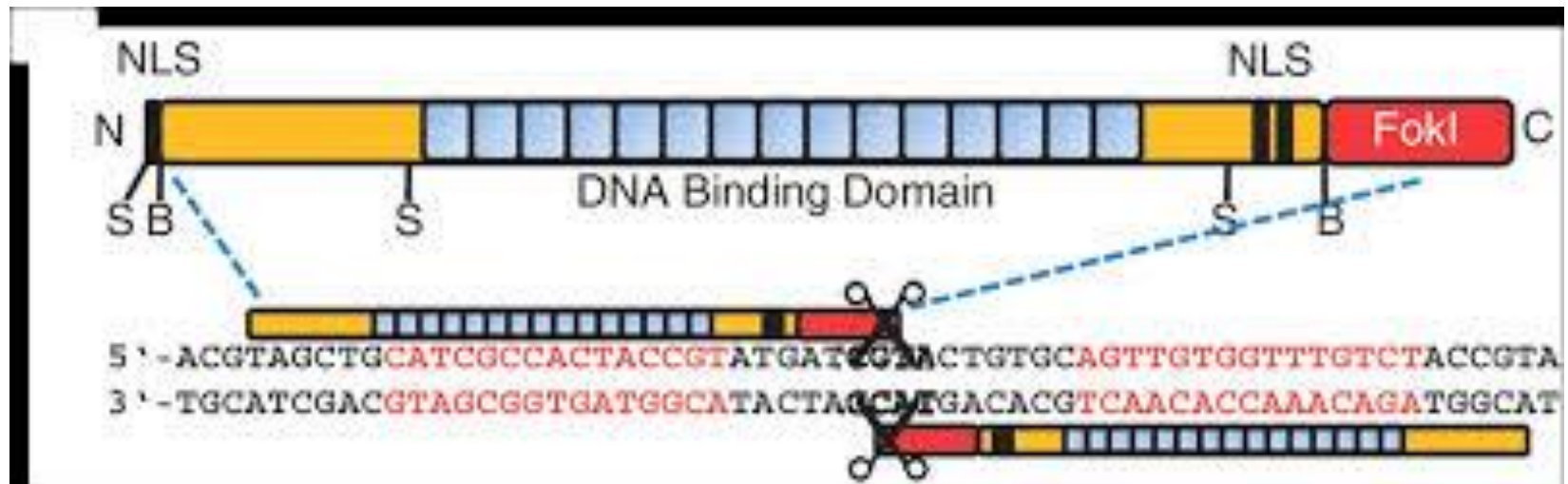
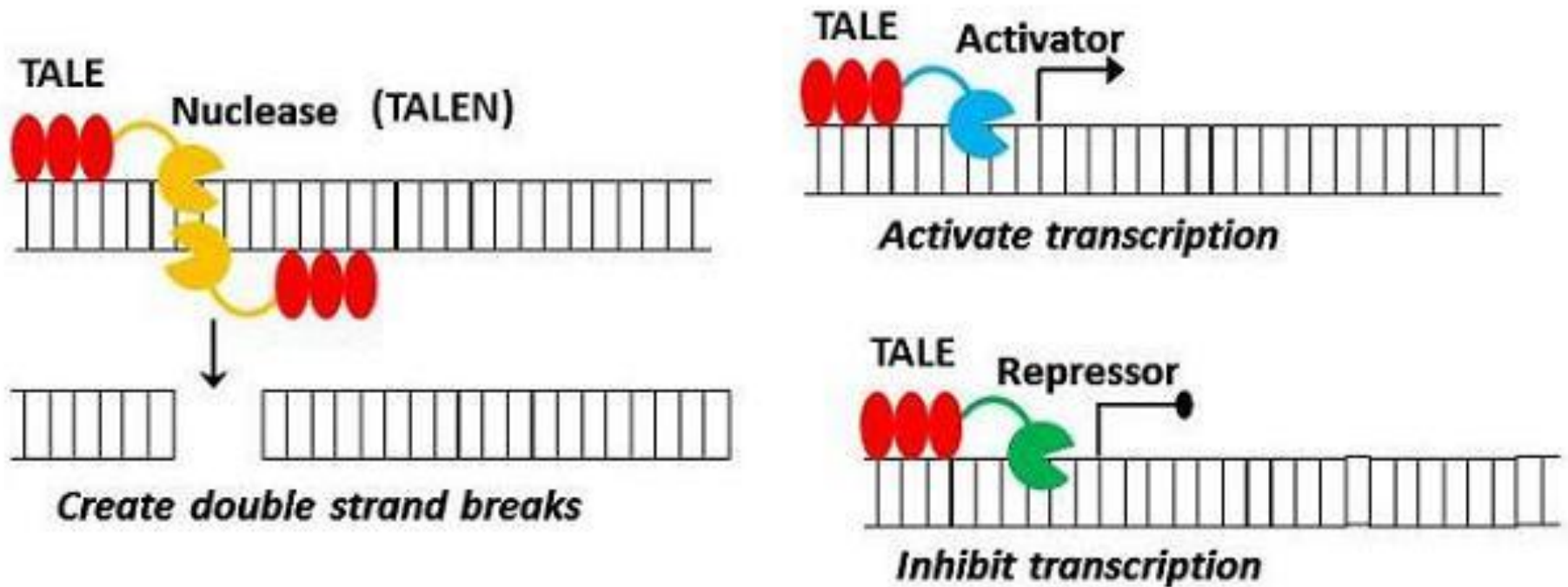
- **zinc-finger nucleases (ZFNs)**
- **transcription activator-like effector nucleases (TALENs)**
- **RNA-guided engineered nucleases (RGENs) derived from the bacterial clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)–Cas (CRISPR-associated) system**

Each **ZFN** is composed of a zinc-finger protein (ZFP) at the amino terminus and the FokI nuclease domain

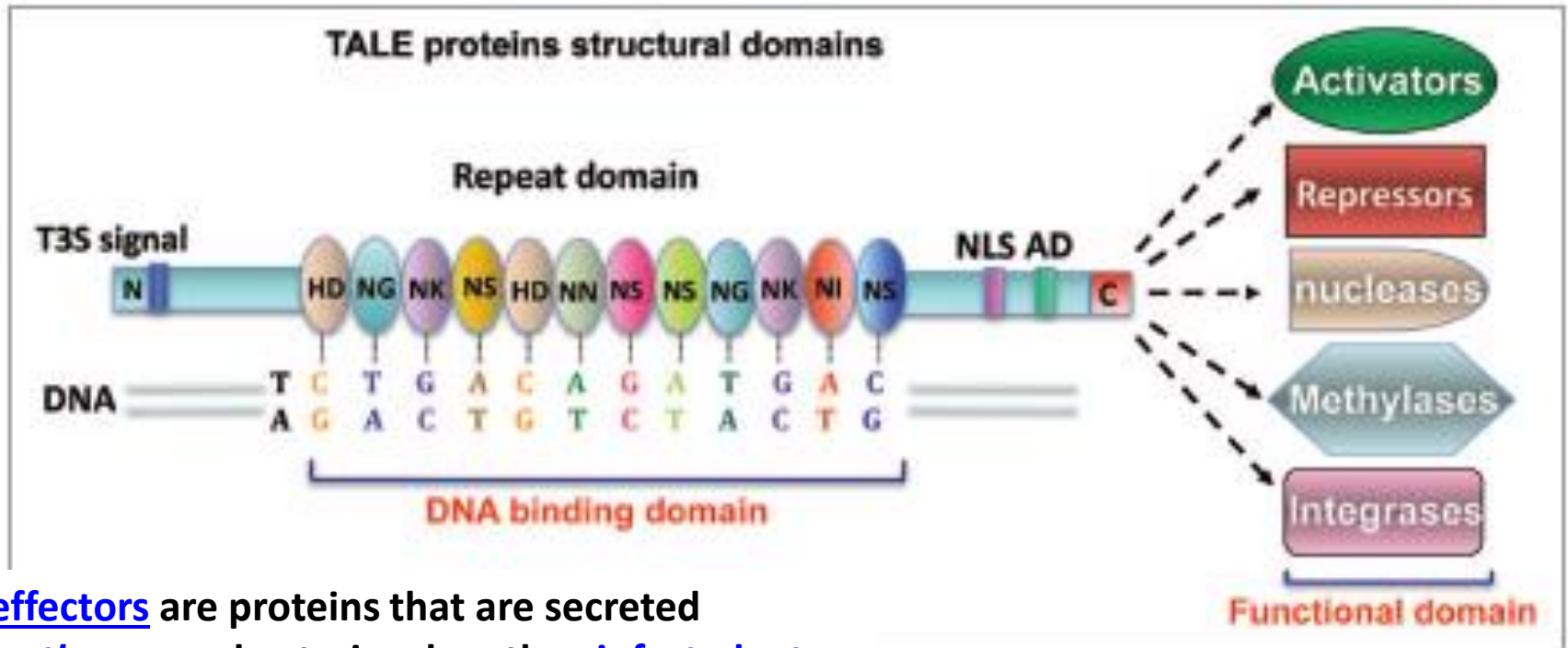
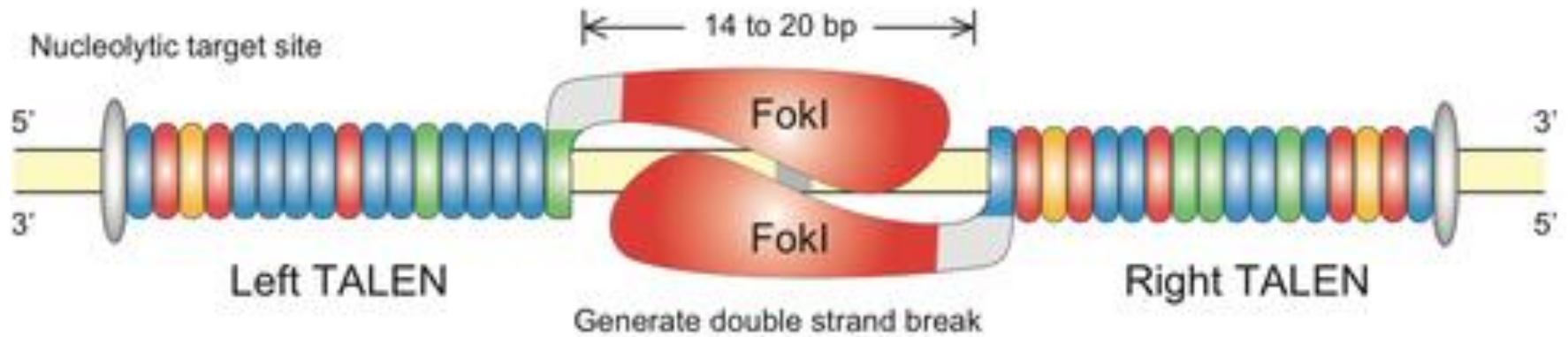




Transcription activator-like effector nucleases (TALEN)

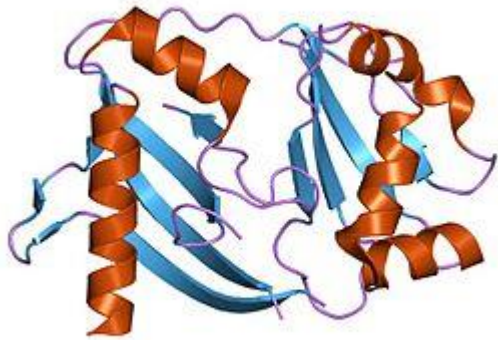


TALEN



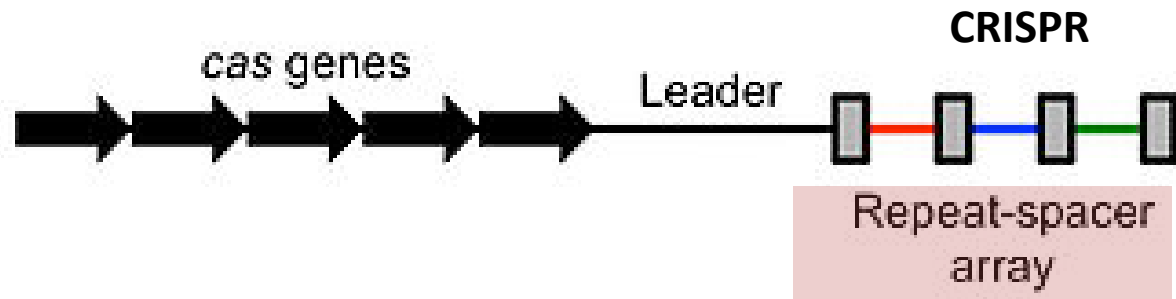
[TAL effectors](#) are proteins that are secreted by [Xanthomonas](#) bacteria when they [infect plants](#).

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) rendszer



Cas9

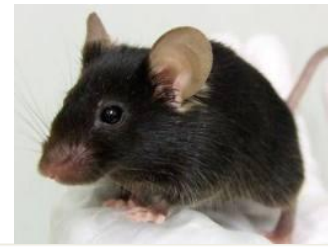
Cas (*CRISPR-associated sequences*) fehérjék



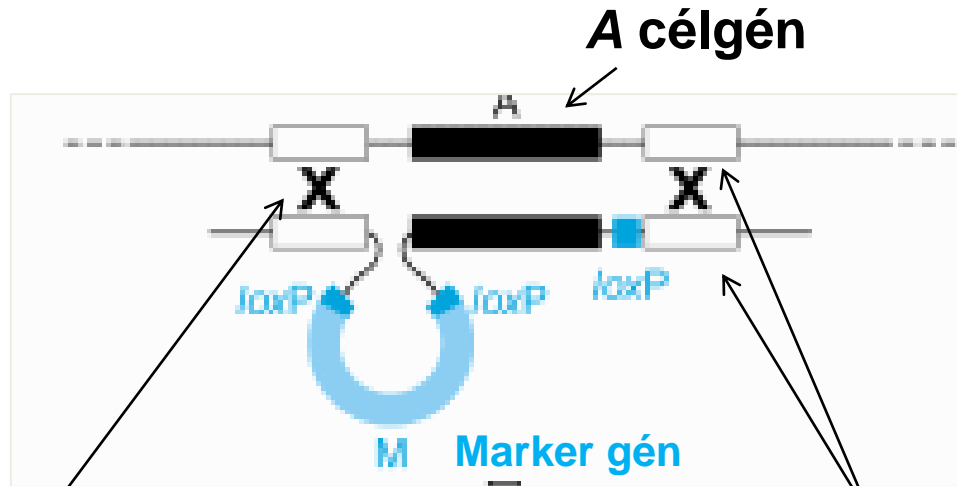
- Olyan DNS lokuszok, amelyek rövid ismétlődő szekvenciákat tartalmaznak *spacer*-ekkel elválasztva. Gyakran kapcsoltak *Cas* génekkel.
- Ilyen szekvenciák az Archaea-ák 90%-ában, az Bacteria-ák 40%-ában.

Forward genetikai analízis

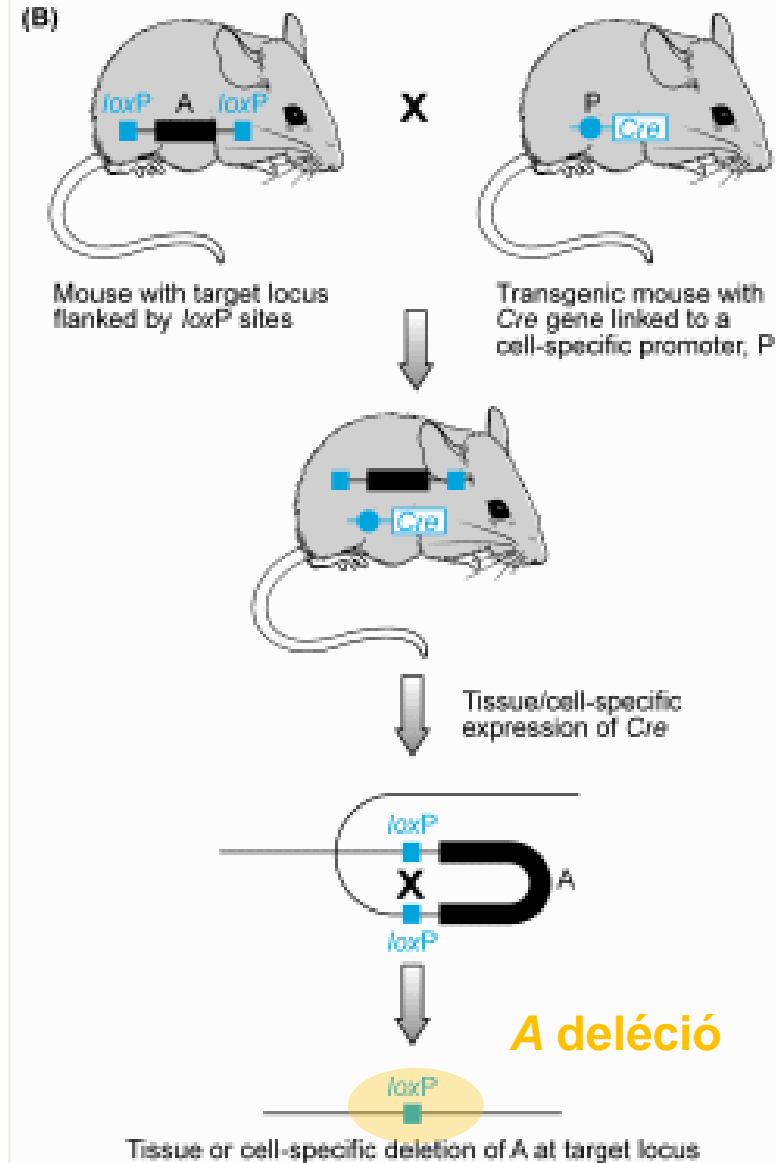
Genomi szekvencia ismerete - *targetálás*



Gene knockout-ot (deléciós mutációk) létrehozása bármely génre

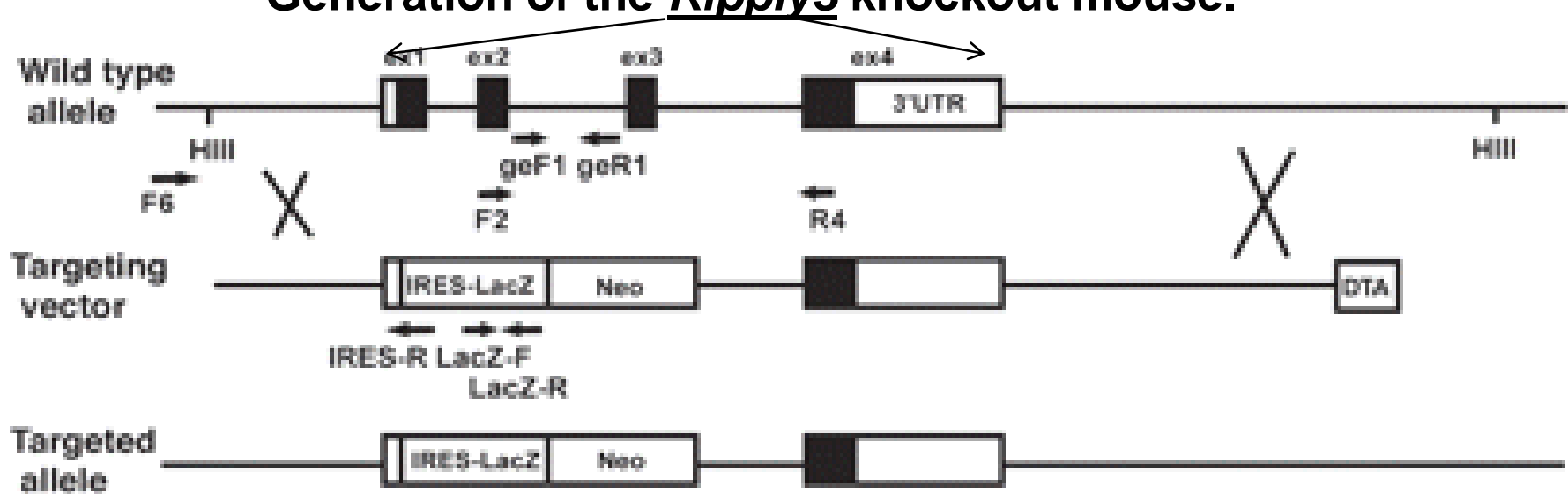


Cre rekombináza



Eredménye

Generation of the *Ripply3* knockout mouse.

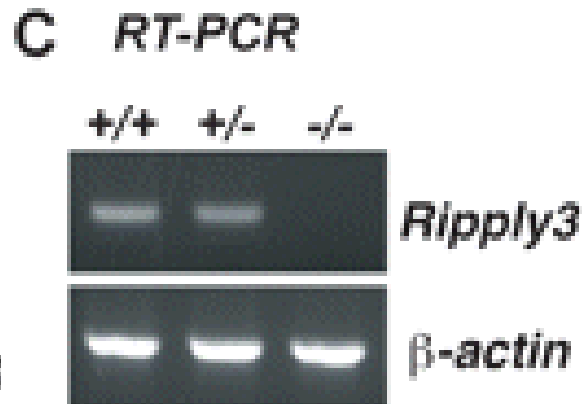


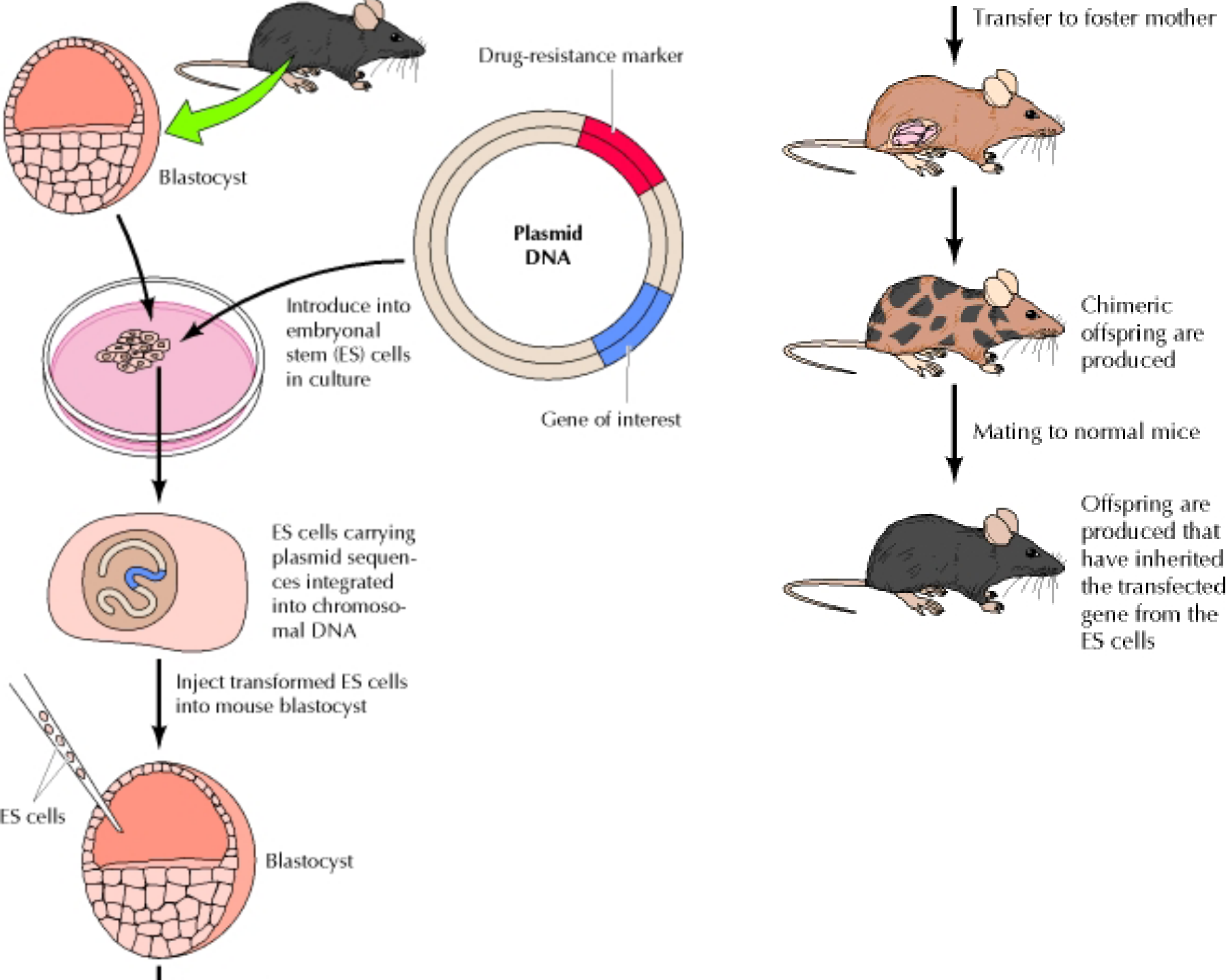
deléció

genomic



mRNS szint





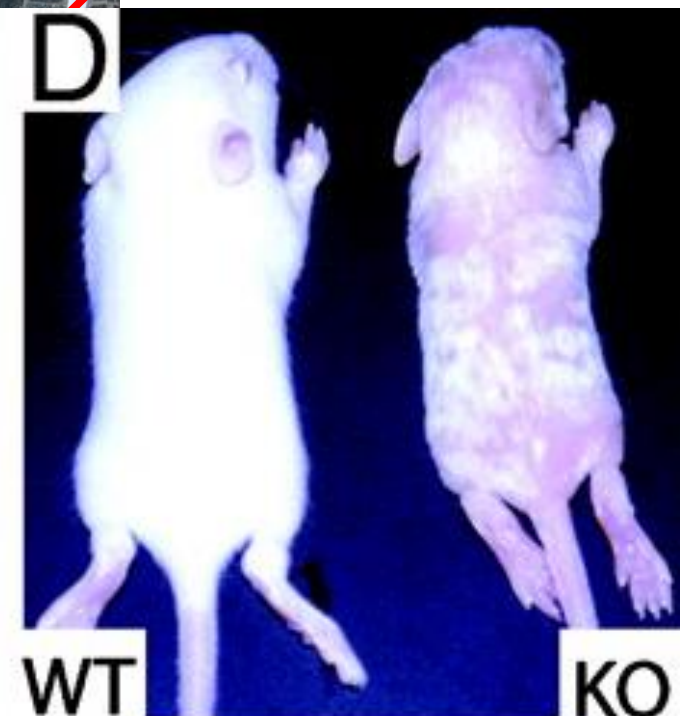
DNS mikroinjektálása megtermékenyített oocitákba (pronukleuszba): transzgénikus egerek



Az injektált DNS további sorsa:

-azonnal integrálódik egy kromoszómába: általában 1 lokuszba és 1-50 kópiában (*head-to-tail concatamers*)

-néhány sejtosztódás után integrálódik a genomba: **genetikai mozaik** állatok

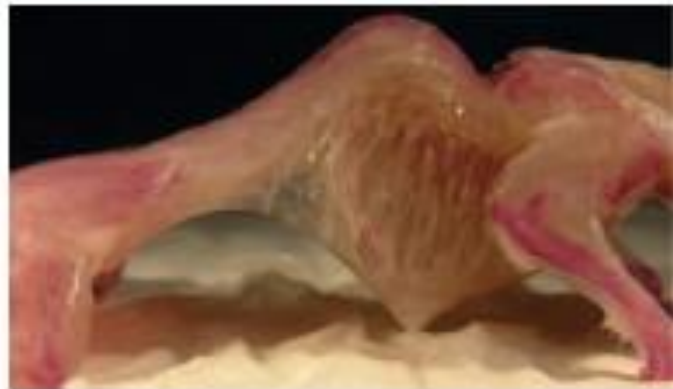


Dystrophin gén KO (kiütött) egér

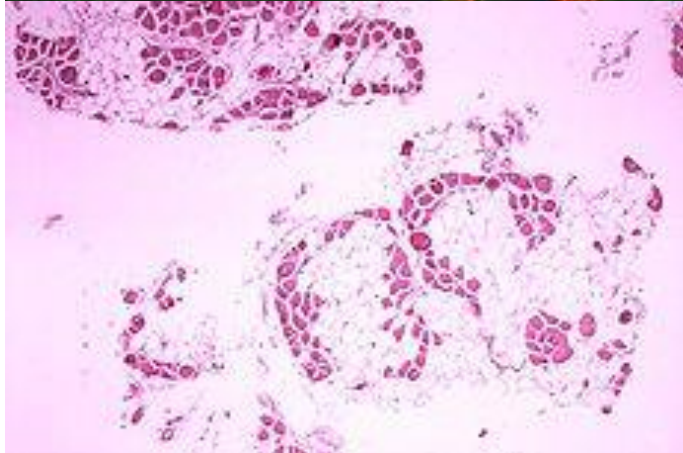
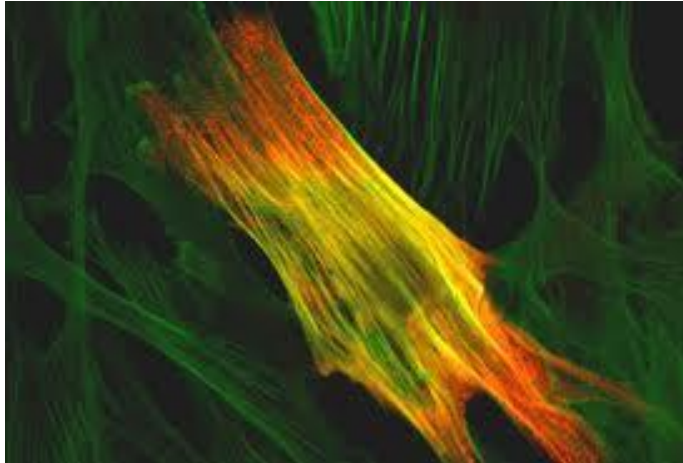
WT



dko



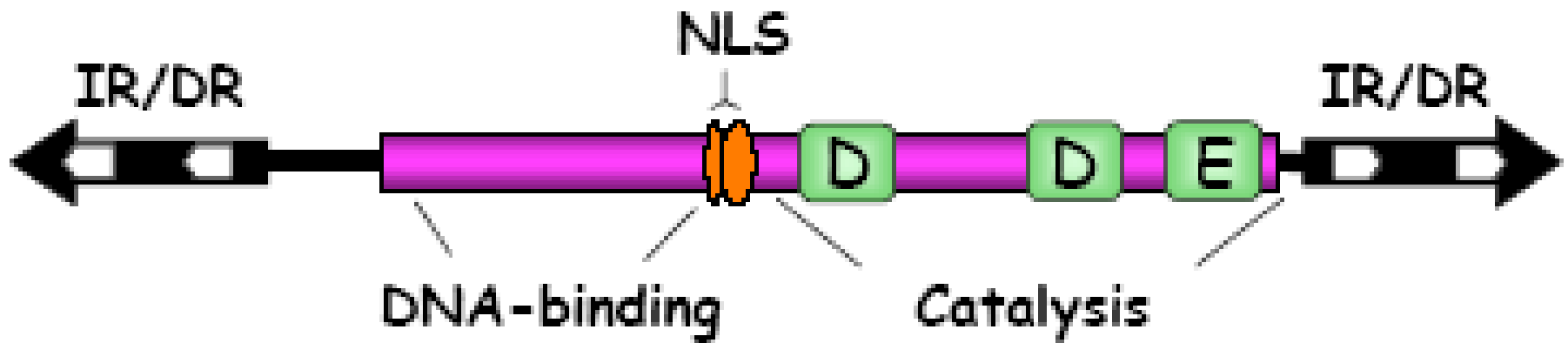
Dystrophin gén mutáns ember: *Duchenne muscular dystrophy*



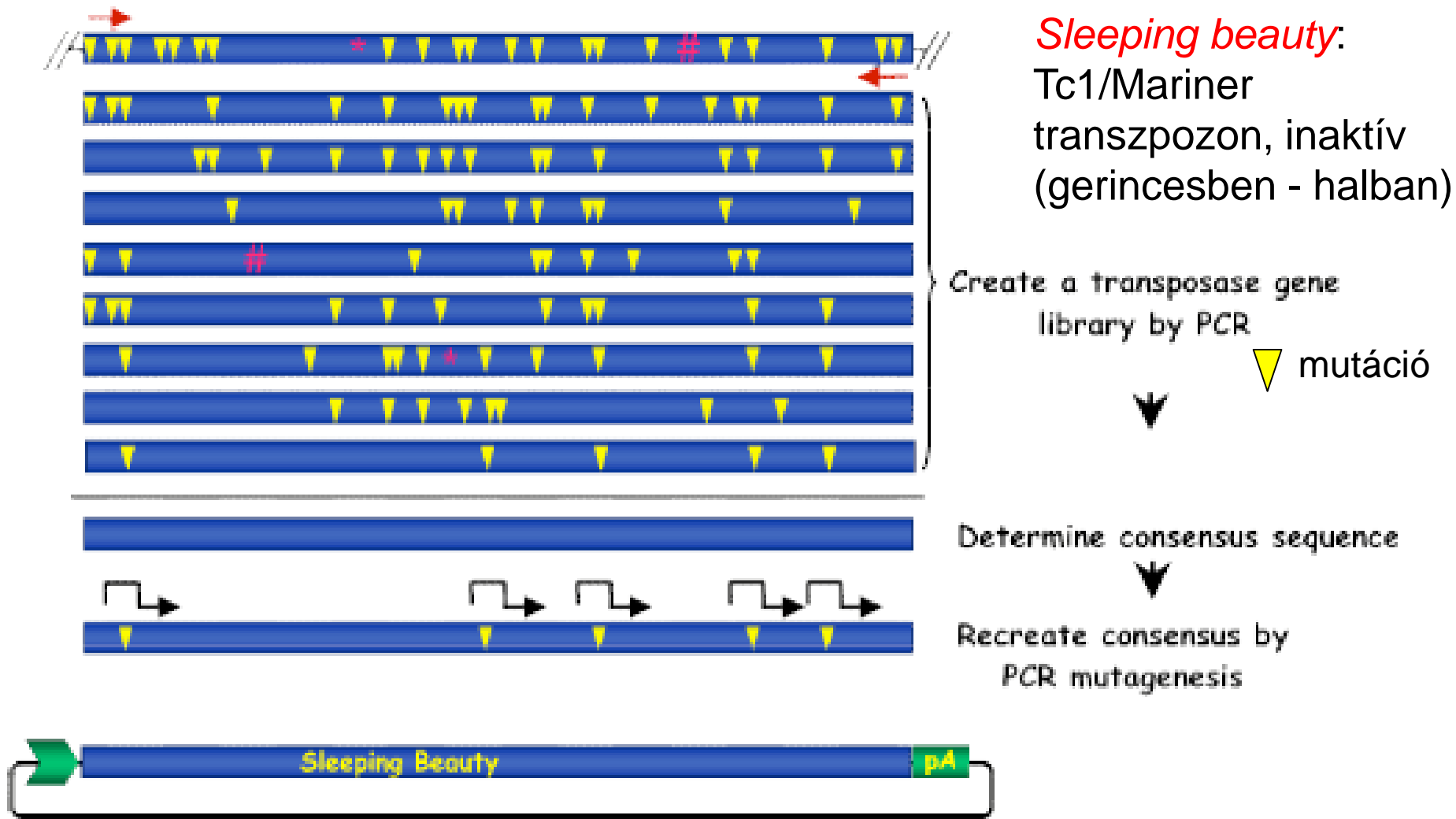
Izom degeneráció
dys gén: X-kapcsolt
1:3600
halálos

Transzgén integrálás a genomba

Tc1/mariner-szerű transzpozonok



Orvosi felhasználás: DNS bevitel

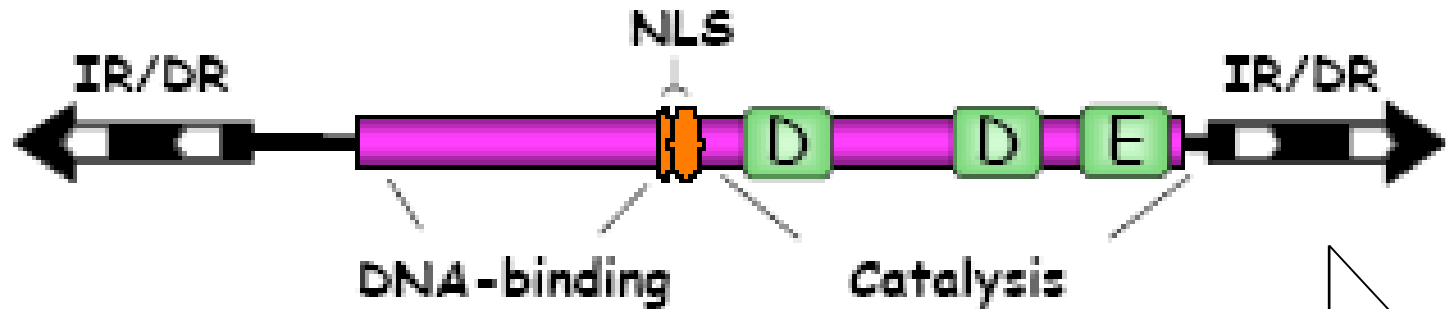


10-15 millió évvel ezelőtt aktív volt. Életre (mozgásra) keltés irányított aminosav cserékkel: „*Kiss back to life*”

Transzpozonok, mint DNS transzfer vektorok

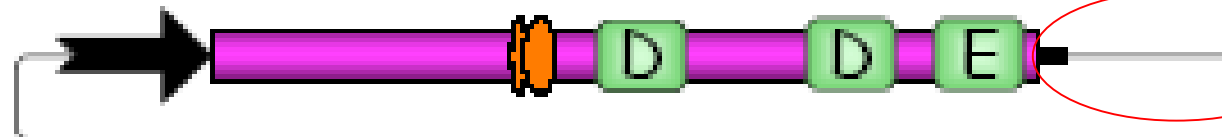
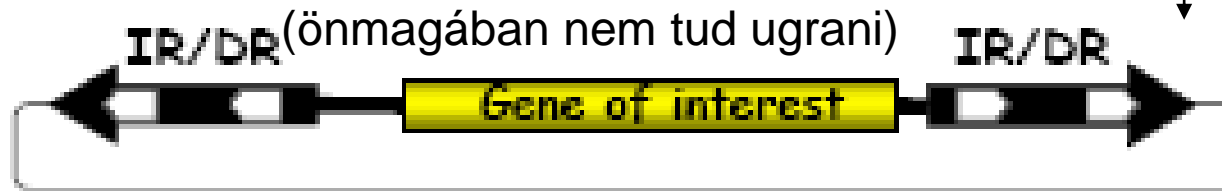
A.

Natural arrangement - the transposase gene is inside the transposon

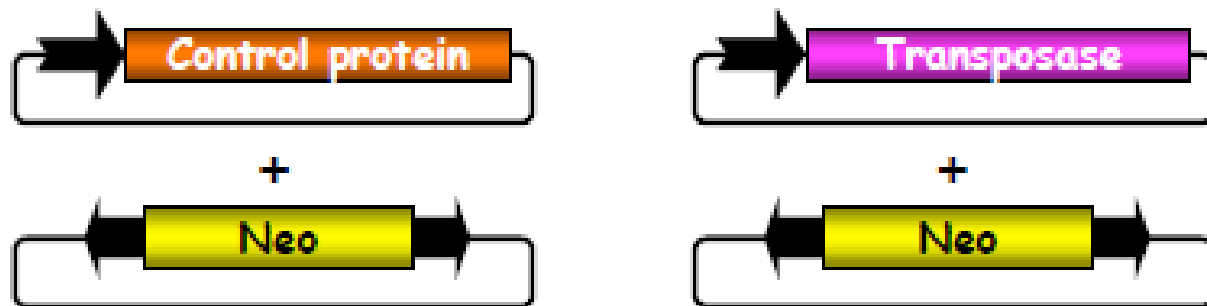


B.

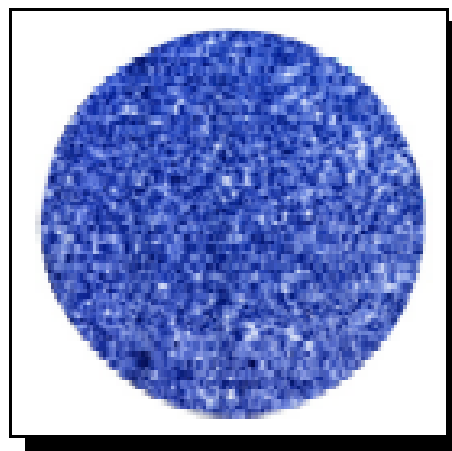
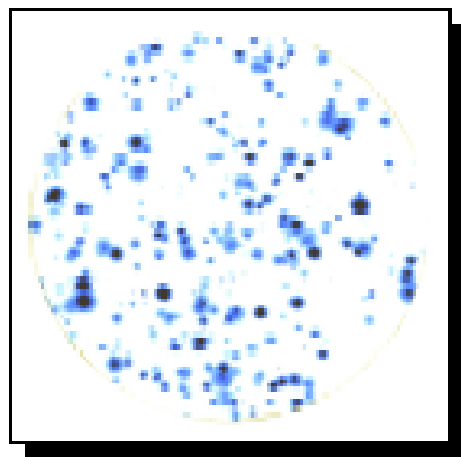
Laboratory arrangement - the two components of the transposon are separated



Transzpozíció sejt kultúrában



Transfection of cells
Antibiotic selection

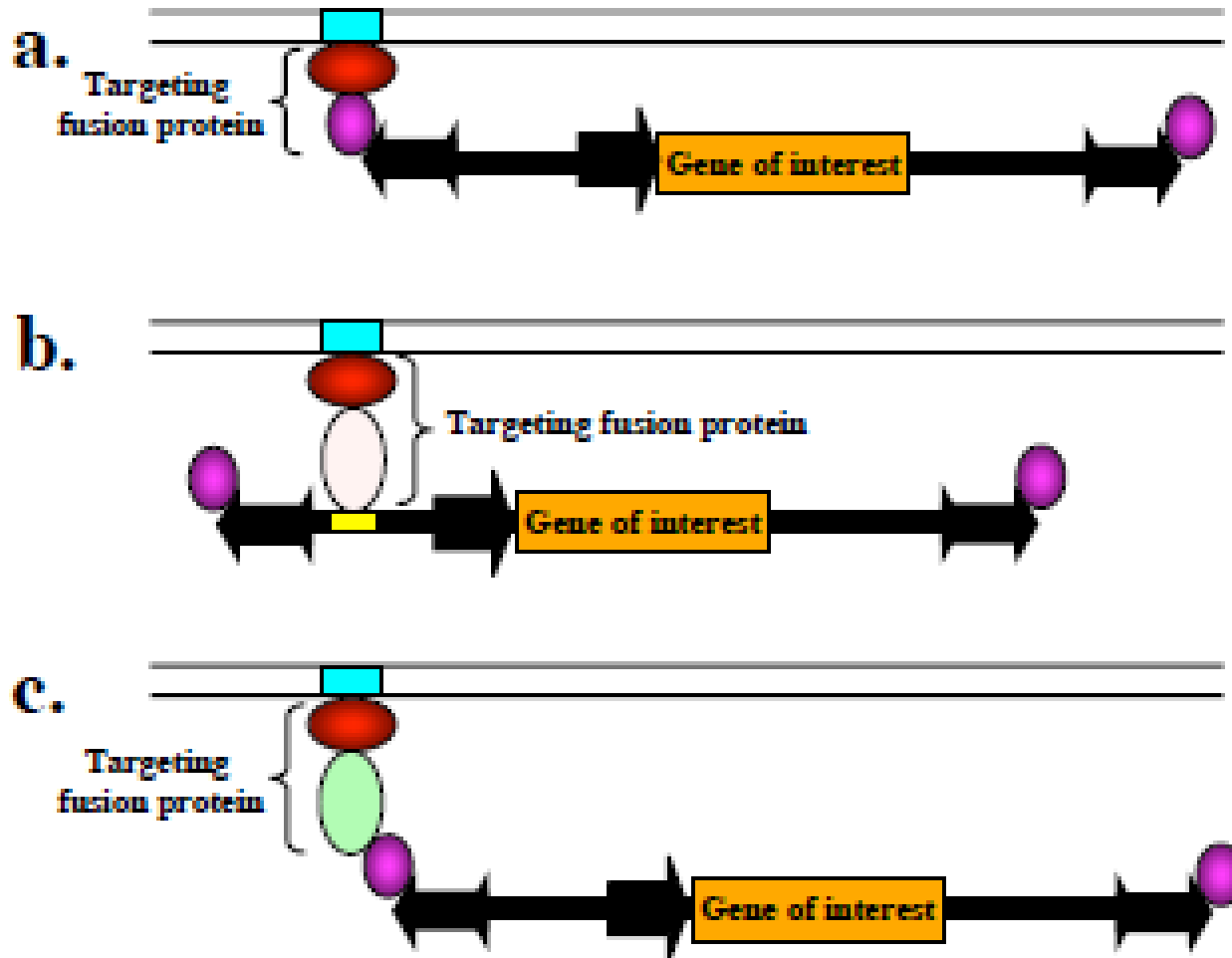


Csak az a sejt kék, amelybe transzfektálódott. Mivel nem integrálódik kromoszómába, nem tud öröklődni.

Kék: rezisztens sejt kolóniák

Transzpozíció a bakteriális vektorról a kromoszómába

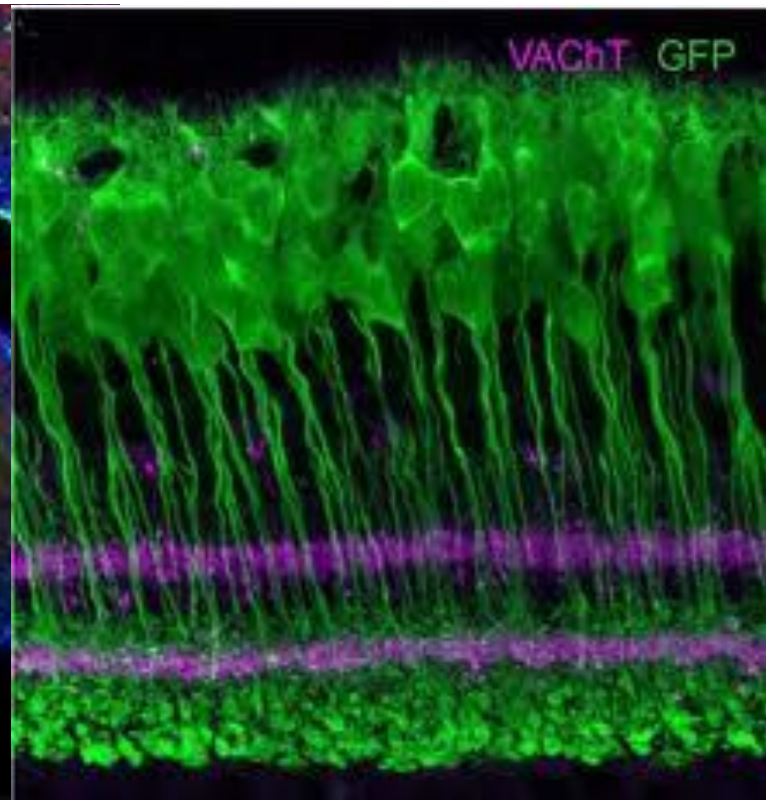
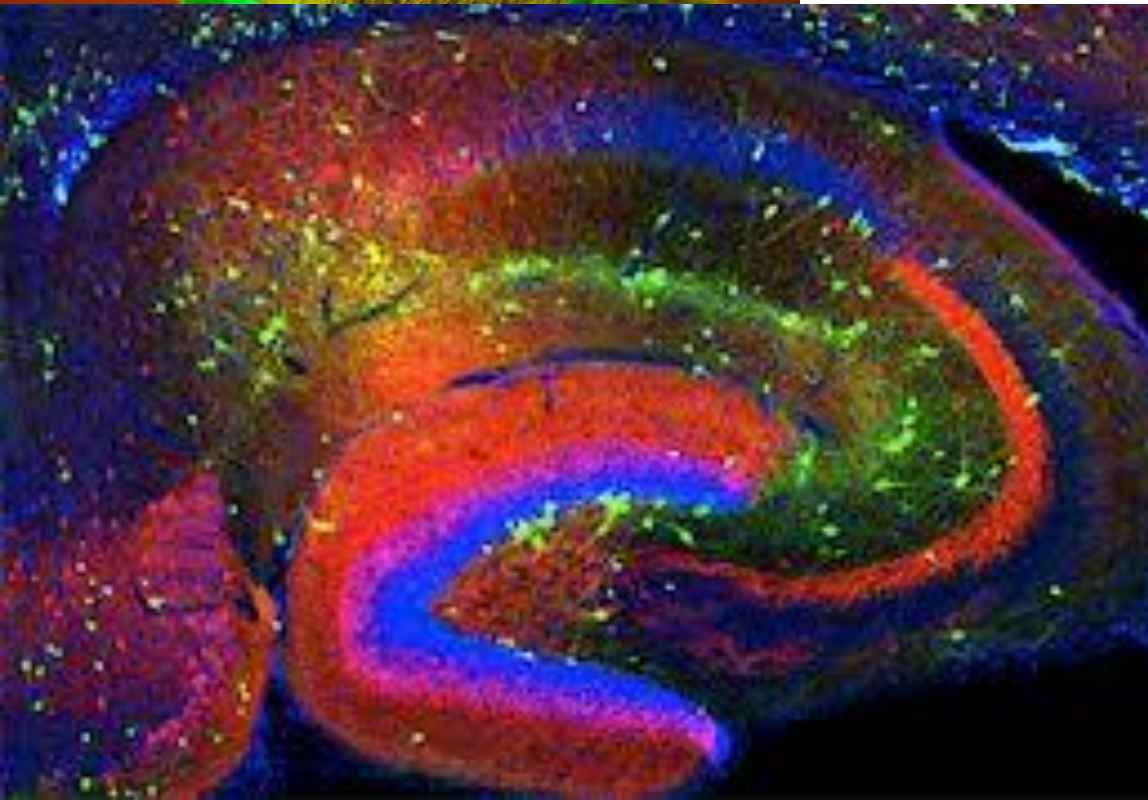
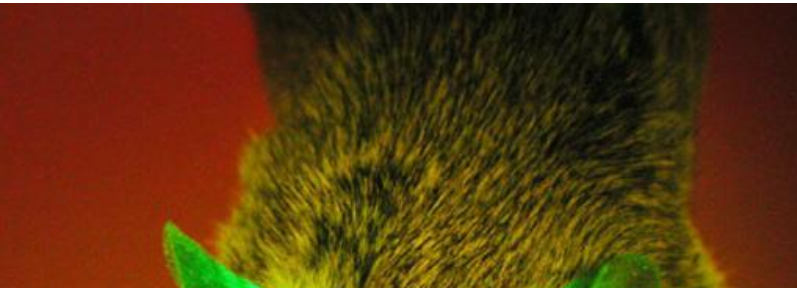
„Targetálni” a *Sleeping Beauty* transzpozíciót a genomban
(ne legyen mutagén!)



Sleeping beauty targeting rendszer



GFP analízis - génexpresszió



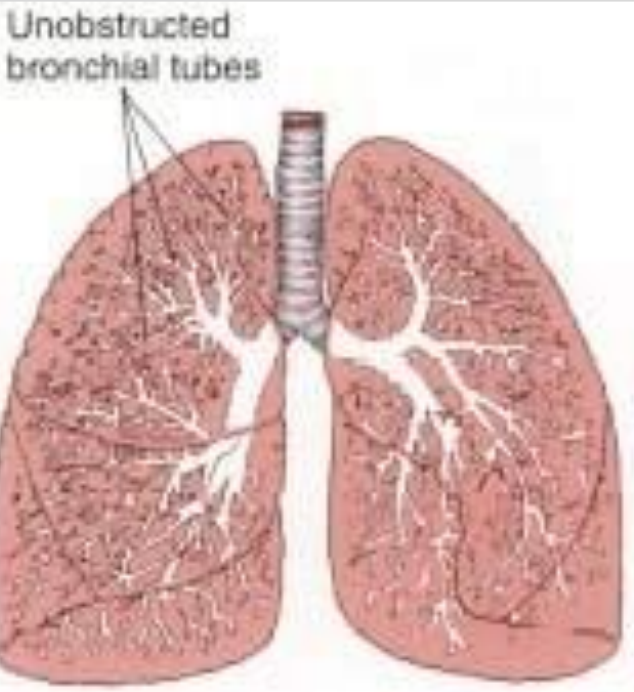
Transzgénikus állatok előállítása - összefoglalás

<u>Célsejt</u>	<u>Módszer</u>
Csírasejt	<ul style="list-style-type: none">-tenyésztett primordiális csírasejtek transzfekciója (emlős)-csírasejteket tartalmazó szövetbe történő injektálás (<i>Drosophila</i>, <i>C. elegans</i>)
Spermium	<ul style="list-style-type: none">-DNS kötése a spermium fejére (emlős)-DNS kötése a spermium magjára (<i>Xenopus</i>)
Oocita/Zigóta	<ul style="list-style-type: none">-mikroinjektálás oocita citoplazmájába (<i>C. elegans</i>, madár,-mikroinjektálás pronukleuszba (emlős)-ES sejt transzfer (emlős)-retrovirális transzfer (emlősök, madarak)
Blasztociszta	<ul style="list-style-type: none">-mikroinjektálás
ES sejt	<ul style="list-style-type: none">-transzfekció-retrovirális transzfer
Szomatikus sejt	<ul style="list-style-type: none">-transzfekció és retrovirális transzfer

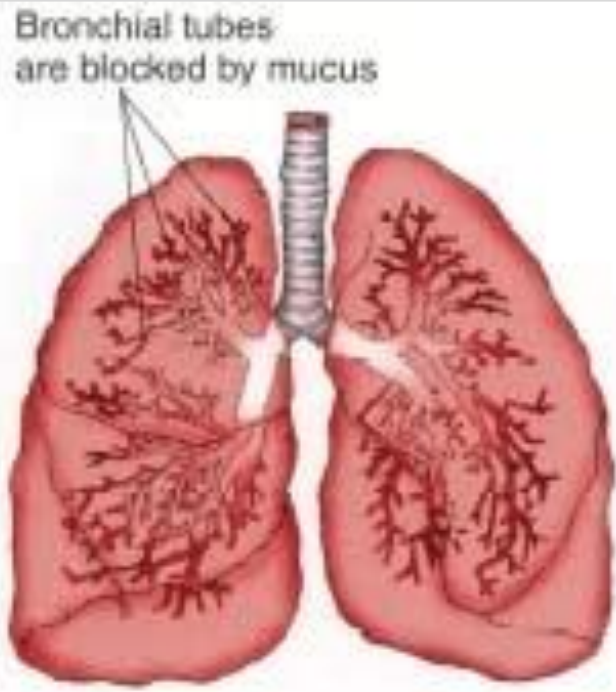
Humán betegség modellek

<u>Humán betegség</u>	<u>Gén</u>	<u>Módszer</u>
Cystic fibrosis	<i>CFTR</i>	inszerciós inaktiválás (i.i.)
B-Thalasemia	<i>HBB (B-globin)</i>	i.i.
Hypercholesterolemia	<i>APOE</i>	i.i.
Fragil-X syndrome	<i>FMR1</i>	i.i.
Spinocerebellar ataxia	<i>SCA1 (ataxin)</i>	integration
Alzheimer's disease	<i>APP</i>	integration

CF is an autosomal recessive disease. The presence of mutations in the protein cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene causes the disease.



Healthy lungs



Lungs with cystic fibrosis