

## Posibles aplicaciones de los transposones de peces a la Acuicultura

Alberto Falco<sup>2</sup>, Ana Rocha<sup>1</sup>, Carolina Tafalla<sup>3</sup>, Amparo Estepa<sup>2</sup>, Julio Coll Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INIA, SGIT – Departamento de Biotecnología  
Carretera de A Coruña, Km. 7 Madrid (España)  
e-mail: juliocoll@inia.es

<sup>2</sup> IBMC Universidad Miguel Hernández  
Universidad Miguel Hernández, 03202 Elche, Alicante (España)

<sup>3</sup> INIA, CISA  
Valdeolmos 28130, Madrid (España)

### Resumen

Una gran parte del ADN de los genomas de todos los vertebrados son secuencias de ADN móviles o transposones (Tns). Aunque los Tns detectados hasta el momento en la mayoría de vertebrados están inactivos, en algunos peces se han descubierto Tns activos. Además, un Tn inactivo de salmónido se ha podido reactivar mediante manipulación genética y se está usando en células de mamífero para numerosas aplicaciones, es el denominado "Sleeping Beauty" o bella durmiente (SB). El estudio de los Tns de peces y sus aplicaciones en peces, permitirá, por ejemplo, su inserción controlada en genomas de especies comercialmente importantes tanto en sus células germinales para obtener peces transgénicos o identificar genes importantes para selección genética convencional (crecimiento, resistencia a enfermedades, etc.) como en sus células somáticas para mejorar la vacunación por ADN (duración de la inmunidad, mejores promotores, etc.). Por tanto, las expectativas para posibles aplicaciones de los Tns de peces para la acuicultura son altas. En este trabajo se revisa el estado actual del conocimiento de los Tns inactivos y activos de peces y se discute brevemente sus posibles aplicaciones futuras a la acuicultura.

*Palabras clave:* Transposones, peces, acuicultura, vacunas ADN

### Summary

#### Possible applications of fish transposons in Aquaculture

A great part of the DNA genomes of vertebrates are mobile sequences or transposons (Tns). Although the majority of the detected Tns in vertebrates were inactive, active Tns have been discovered in some fish. Furthermore an inactive salmonid Tn has been reactivated by genetic manipulation and is being actually used for a number of applications in mammals, is the so called "sleeping beauty" (SB). The study of the fish Tns and their possible applications in fish would allow for instance, their controlled insertion in genomes of economically important species, in their germinal cells to obtain transgenics or to identify important genes for traditional genetic selection (growth, disease resistance, etc) and/or in their somatic cells to improve DNA vaccination methods (duration of immunity, improvement of promoters, etc). Therefore the expectations for applications of the fish Tns for aquaculture are high. In this work the actual state of knowledge has been revised about the active and inactive fish Tns discussing briefly their possible applications in aquaculture.

*Key words:* transposons, fish, aquaculture, DNA vaccines

## Transposones (Tns) de peces basados en ADN-ARN-ADN y ADN-ADN

Los transposones (Tn) son secuencias de ADN presentes en los genomas que tienen la propiedad de cambiar de un sitio a otro dentro del genoma. Al menos un 40% del ADN de los genomas de vertebrados incluidos los de peces, está compuesto por numerosas copias de distintas familias de Tns. Según la familia de Tns, el número de

copias por genoma haploide puede variar desde 10 a varios miles (ver leyenda de Tabla 1 para nomenclatura de Tns).

Según su estructura y su mecanismo de acción, los Tns pertenecen a: i) la familia de los ADN-ARN-ADN, que utilizan intermediarios de ARN para transponer secuencias ADN después de la transcripción reversa de su ARN a ADN; y, ii) la familia de los ADN-ADN, que directamente transponen ADN a ADN.

Hay tres tipos de Tns en la familia de los ADN-ARN-ADN: los elementos interdispersos cortos (SINEs), los elementos interdispersos largos (LINEs) y los retrovirus. Los SINEs utilizan una copia de ARN para transponerse de un locus a otro dependiendo de la presencia de una transcriptasa reversa codificada en un LINE paralelo. Los SINEs identificados en peces son de pequeño tamaño (200-300 pb), están presentes en un número grande de copias (10 000-100 000 copias por genoma haploide) y no tienen repeticiones terminales (RT). Los retrovirus tienen repeticiones terminales largas de ~600 pb (RTL) y codifican una transcriptasa reversa y otros polipéptidos. En peces se han detectado pocos retrovirus (Poulet y cols., 1994) que pertenecen tanto a los retrovirus endógenos (Hronek y cols., 2004) como a los exógenos (Shen y Steiner, 2004). Las características de los Tns basados en ADN-ARN-ADN de peces se revisan en un trabajo reciente (Tafalla y cols., 2006) y no se van a tratar en este trabajo.

La mayoría de los Tns basados en ADN-ADN son de 1 000-5 000 pb, 10-10 000 copias por genoma haploide y contienen una enzima transposasa flanqueada por dos repeticiones terminales invertidas (RTI) en 5' y 3' de 10-200 pb. Es decir su estructura es del tipo 5' RTI-transposasa-RTI 3'. Su movilidad depende de la presencia de una transposasa que corte y pegue las secuencias flanqueadas por las dos RTI, para transponerlas de un locus a otro del genoma. La secuencia completa de la transposasa puede estar incluida (elementos autónomos) o no (elementos no autónomos) en la secuencia del Tn. Los principales Tns basados en ADN-ADN en peces pertenecen a las familias Tc1 (SB/RTI) y Tol2 (Tabla 1).

**Tabla 1.** Propiedades de los Tns ADN-ADN de peces mejor caracterizados.

Nombre Tn	Especie	* pb	RTI, *pb	copias/ genoma haploide	activo	número en GenBank
Tip1	<i>Ictalurus punctatus</i>	1 135	85	?	?	X52617
Tes1	<i>Eptatretis stouti</i>	1 499	66	?	?	M93037 - M93040
Ssal1	<i>Salmo salar</i>	1 535	35	15 000	no	L22865
Tel1	<i>Esox lucius</i>	1 009	223	?	no	L41172
Tdr1	<i>Danio rerio</i>	1 205	208	1 000	no	L12210, L33472, L33469
Tdr2	<i>Danio rerio</i>	1 100	100	1 000	no	AJ242983, L48874
Tcc1	<i>Cyprinus carpio</i>	866	209	?	no	L48683
Tcch1	<i>Chionodraco hamatus</i>	802	80	?	no	AF305833, AY008266
Tom1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1 689	221	?	no	L12209
Tss1 Tss2	<i>Salmo salar</i>	1 619	226	?	no	L12206 - L12208, L22865
Tzf	<i>Danio rerio</i>	1 600	200	700	sí?	U51226 - U51230
Tpp1	<i>Pleuronectes platessa</i>	1 627	200	150	sí?	AJ249083, AJ249085, etc
Tsn1	<i>Salvelinus namaycush</i>	1 643	225	?	sí?	AF017232-34
SB10	<i>S. salar</i> + <i>O. mykiss</i>	1 639	225	sintético	sí	---
Tol2	<i>Oryzias latipes</i>	4 700	12	10-30	sí	D84375

RTI, repeticiones terminales invertidas. \* pb, tamaños aproximados en pares de bases. Subrayado, las iniciales que describen las familias de los Tns. Los Tns se nombran utilizando la T mayúscula seguida de las iniciales en minúsculas del género y la especie correspondientes (subrayados en la tabla), seguidos de un número de orden en cada familia según se van descubriendo.

A diferencia de mamíferos, en peces se han detectado algunas transposiciones activas y secuencias completas de transposasas. En el presente trabajo revisamos el estado actual del conocimiento sobre Tns activos e inactivos de la familia ADN-ADN en peces y su posible uso en un futuro.

## **Tc1 en peces**

---

La mayoría de las secuencias de Tc1 que se han descrito en peces están incompletas o tienen mutaciones que las inactivan (Tabla 1).

Sin embargo y a diferencia de otros vertebrados, se han detectado transposiciones de Tzf1 en pez cebra (Lam y cols., 1996) y secuencias Tc1 completas en *Salvelinus namaycush* y *Pleuronectes platessa* (Leaver, 2001; Reed, 1999). Todo ello sugiere que hay transposición activa en algunos peces y que probablemente exista transposición activa en otros peces comercialmente relevantes aunque todavía no se hayan detectado.

Mediante sondas derivadas de las transposasas Tc1+Tes1, se detectaron unas 700 copias de una secuencia de 1621 pb (Tzf1) en pez cebra (Lam y cols., 1996). Algunas de estas copias se movilizaban durante la reproducción pues se detectaron 3,9 transposiciones por descendiente.

Además, algunas copias con secuencias completas de Tsn1 (detectada por PCR) se identificaron en el genoma de la trucha de lago *Salvelinus namaycush* (Izsvak y cols., 1995; Reed, 1999). La secuencia consenso de Tsn1 fue de 1643 pb (correspondiente a una transposasa completa de 340 aminoácidos) y estaba flanqueada por RTI de 225 pb. La secuencia de aminoácidos de Tsn1 sólo se diferenciaba en 3 aminoácidos de la transposasa activa SB (ver después), por lo que es muy probable que algunas copias de Tsn1 todavía retengan actividad. Se demostró que Tsn1 también se encuentra en otros salmónidos y ciprínidos.

Igualmente se detectaron ~60% de copias de la secuencia completa de la transposasa (1627 pb) Tpp1 (identificada como una inserción en un gen) entre las 150 copias existentes en *Pleuronectes platessa* (Leaver, 2001), lo que sugiere que pueda estar todavía activa. Secuencias similares a Tpp1 se han encontrado también en *Pleuronectes flexus* y *Limanda limanda* y unas 600 copias por genoma, aunque diferentes e incompletas, se encontraron en *Salmo salar* y *Salmo trutta*.

## **Reactivación y mejora de Tc1: El modelo SB**

---

A partir de copias defectuosas de Tss1 y Tom1 y mediante mutagénesis dirigida para corregir las mutaciones que la inactivaban, se obtuvo una transposasa Tc1 activa en células de mamíferos. Consiste en un gen que codifica para una transposasa de 1 600 pb flanqueado por RTI de 225 pb. Se le llamó "Sleeping Beauty" o SB (Ivics y cols., 1997).

Para controlar la inserción genómica estable de otros genes utilizando SB, se han desarrollado sistemas duales de transposición (SB/RTI). Un sistema dual funciona mediante la cotransfección o introducción de dos plásmidos en la misma célula: el plásmido donante y el de ayuda. El plásmido donante contiene una construcción de expresión del gen (promotor-gen-terminador) flanqueada por dos RTI (5' RTI-promotor-gen-terminador-3' RTI) y el plásmido de ayuda contiene la transposasa SB bajo el control de un promotor. La cotransfección de ambos plásmidos (donante y de ayuda) en una misma célula, provoca primero la expresión de la transposasa SB y

después la transposasa SB corta el plásmido donante por las 2 RTI y pega toda la construcción en el genoma de la célula huésped. Para poder cortar y pegar las RTI del plásmido donante (Plasterk y cols., 1999), la transposición mediada por SB no sólo requiere una transposasa SB completa y activa en el plásmido de ayuda sino también 2 sitios de unión para la transposasa en las 225 pb de las RTI en el plásmido donante (Izsvak y cols., 2000; Izsvak y cols., 2002), además de cofactores celulares todavía poco conocidos (Yant y Kay, 2003; Zayed y cols., 2003). Para su uso óptimo en células humanas, se realizaron unas 40 mutaciones en la transposasa SB para obtener la primera versión activa, la SB10 (Geurts y cols., 2003; Ivics y cols., 1996; Plasterk y cols., 1999; Yant y cols., 2004; Zayed y cols., 2004) y las primeras versiones de RTI1 (Cui y cols., 2002; Izsvak y cols., 2000; Yant y cols., 2004). Las versiones mutantes SB11, SB12 y HSB3 de la transposasa mejoraron entre 2-8 veces la eficiencia de transposición, después de ensayar otras 200 mutaciones, la mayoría de ellas inútiles. La combinación de alguna de estas transposasas nuevas con las versiones mejoradas RTI2 y RTI3 (en total unas pocas pero muy específicas mutaciones respecto a las versiones iniciales) produjeron un aumento en la eficiencia de transposición en células de mamífero de unas 14 veces con respecto a las versiones originales.

La actividad de transposición de los sistemas SB/RTI se ha mejorado también mediante el uso de distintos promotores dependiendo de su aplicación. Por ejemplo, para un modelo de ratón de terapia génica *in vivo*, los mejores niveles de transposición se obtuvieron utilizando un promotor 4 veces menos activo en la transposasa SB que en el gen de la construcción RTI (Mikkelsen y cols., 2003). Sin embargo, para aumentar la eficiencia de transposición para mutagénesis insercional en ratones, se utilizaron las versiones mejoradas SB11/ITR2 y un promotor pequeño y altamente eficaz para el gen de la construcción RTI2 (Collier y cols., 2005; Dupuy y cols., 2005).

Se ha comprobado que los sistemas duales de transposición SB/RTI funcionan en muchas líneas celulares de mamíferos y peces (Dupuy y cols., 2002; Izsvak y cols., 2000), además de en ratones transgénicos (Dupuy y cols., 2002; Horie y cols., 2003; Masuda y cols., 2004; Yant y cols., 2000; Yusa y cols., 2004), medaka (Grabher y cols., 2003) y pez cebra (Davidson y cols., 2003). Otras mejoras adicionales para optimizar la eficiencia de transposición en células de pez, podría aumentar las posibles aplicaciones del sistema dual SB/RTI en acuicultura (Tafalla y cols., 2006).

## **Tol2 activos de Medaka**

---

Los Tol2 se descubrieron al estudiar las secuencias de ADN de una inserción en el gen de la tirosinasa en medaka (*Oryzias latipes*) que provocaba medakas albinos (Koga y cols., 1996). La inserción Tol2 tenía 4700 pb flanqueadas por RTI de 19 pb y 2 repeticiones invertidas internas (RII) de ~300 pb. Existían 10-30 copias de Tol2 por genoma haploide que tenían secuencias casi idénticas y contenían una transposasa (Koga y Hori, 2000) (Tabla 1).

La observación de la excisión de Tol2 durante la embriogénesis (Koga y cols., 1996) y la presencia de secuencias de transposasas completas, sugirieron que dichas transposasas estaban activas. La transposición activa se demostró después en células (Kawakami y cols., 2004) y en huevos fertilizados (Tsutsumi y cols., 2003).

Trabajos posteriores mostraron que un sistema dual Tol2/ITR funcionaba en huevos de pez cebra que no poseen Tol2 (Kawakami y cols., 2000). El sistema dual consistía en una construcción Tol2/ITR delecionando 1500 pb de la transposasa e insertando en su lugar genes de resistencia a antibióticos. Esta construcción se coinyectó a

huevos de pez cebra junto con ARNm de la transposasa Tol2 (Tsutsumi y cols., 2003). Mejoras en la producción *in vitro* del ARNm de la transposasa y la utilización del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) junto con un promotor y terminador, aumentaron la transposición del gen de GFP a un ~50% de la progenie del pez cebra (Kawakami y cols., 2004).

Los Tol2 han mostrado que existen otras posibilidades para inhibir y controlar la transposición, además de la inactivación de Tns ampliamente utilizada por los Tc1. Se trata de la producción de ARNm largos y cortos de Tol2 para activar o inhibir la transposición, respectivamente (Tsutsumi y cols., 2003). Además, la localización extranuclear de la transposasa Tol2 (Iida y cols., 2004) podría estar siendo utilizada como otro inactivador, a diferencia de la localización intranuclear de las transposasas Tc1 (Ivics y cols., 1997; Yant y cols., 2004).

Como las transposasas Tol2 funcionan en células de otras especies de peces además de en medaka y los Tol2 tienen capacidad para insertar genes de mayor tamaño que los Tc1 (Kawakami y cols., 2004; Kawakami y Noda, 2004), sus posibles aplicaciones a la acuicultura ofrecen nuevas oportunidades (Koga, 2004).

### **Posibilidades de obtención de peces transgénicos utilizando Tns**

El sistema SB/RTI, el primer ejemplo en vertebrados de transposon reactivado, se ha desarrollado principalmente para generación de ratones transgénicos (Dupuy y cols., 2005; Dupuy y cols., 2002; Ivics y cols., 2004; Miskey y cols., 2005), para mutagénesis insercional en ratones (Clark y cols., 2004) y para vector de terapia génica en humanos (transformación de células somáticas) (Essner y cols., 2005; Izsvak y Ivics, 2003; Liu y cols., 2004; Miskey y cols., 2005) (Tabla 2). Para generar ratones transgénicos estables, se necesita evitar las transposiciones masivas (Davidson y cols., 2003; Grabher y cols., 2003), mientras que para mutagénesis insercional se necesita aumentar la eficiencia de transposición y el número de copias (Collier y cols., 2005; Dupuy y cols., 2005).

**Tabla 2.** Algunas de las posibles aplicaciones de los Tns de peces.

<b>Función</b>	<b>Propósito</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencias</b>
Pérdida de	Identificación de genes	Marcado de genes mutantes deficientes	Clark y cols., 2004; Gollin y cols., 2002
	Vectores transgénicos	Transgénicos	Davidson y cols., 2003
Ganancia de	Trampas de amplificadores	Identificación de amplificadores	Balciunas y cols., 2004; Grabher y cols., 2003
	Trampas de promotores	Identificación de promotores	Westerfield y cols., 1992
	Trampas de terminadores	Identificación de señales Poly(A)	Yoshida y cols., 1995; Zambrowicz y cols., 1998
	Inmunización*	Vacunas ADN	Coll, 2001
	Inducción de oncogenes	Identificación de oncogenes marcados	Collier y cols., 2005; Dupuy y cols., 2005

Tabualdo y modificado de Wadman (Wadman y cols., 2005), Hackett (Hackett y Álvarez, 2000), Coll (Coll, 2001) y Tafalla y cols., 2006).

\*evidencia preliminar

Sin embargo, mientras que el uso *in vivo* de los Tns en mamíferos resulta favorecido por la ausencia de copias activas de transposasas (evita la excisión y aumenta la

estabilidad de los genes insertados), la posible existencia de copias activas de algunos Tns en peces, complica la situación aunque también podría ofrecer algunas ventajas. En otras palabras, la presencia de transposasas activas en peces podría ser tanto una ventaja (sólo el plásmido donante sería necesario para activar la transposición o la eficiencia de transposición será más alta) como una desventaja (los insertos serían muy inestables).

El sistema SB/RTI ya se ha usado para expresar la proteína verde fluorescente (GFP) en pez cebra (Davidson y cols., 2003) y medaka (Grabher y cols., 2003). Al secuenciar las inserciones de construcciones RTI inducidas por SB se demostró que 10 de 10 líneas de peces cebra transgénicos eran el resultado de transposiciones inducidas por SB (Liu y cols., 2004). Sin embargo, sólo 1 de 10 de líneas de medaka transgénicos eran inducidas por la SB, siendo las otras 9 el resultado de recombinaciones inespecíficas (Davidson y cols., 2003; Grabher y cols., 2003). La concentración de las construcciones RTI, la proporción molecular entre transposasas exógenas y RTI, la posible influencia de factores específicos de las especies del pez huésped, la interferencia de posibles secuencias de Tns relacionadas endógenas y/o otros mecanismos de control todavía desconocidos, podrían ser algunos de los factores que explicaran las importantes diferencias obtenidas entre pez cebra y medaka transgénicos. Esas mismas variables se deberán estudiar para poder aplicar los Tns a la transgénesis de especies de peces comercialmente importantes.

Las probabilidades de poder encontrar un carácter deseable entre nuevos peces transgénicos es mayor cuantos más transgénicos distintos podamos producir, es decir del porcentaje (eficiencia) de transgénicos obtenido por cada método (Kawakami y cols., 2004). Los métodos utilizados hasta ahora muestran los siguientes resultados en pez cebra: con la inyección de plásmido se obtuvo ~5% de eficiencia (Stuart y cols., 1990), con un Tn de gusano se obtuvo ~37% de eficiencia (Raz y cols., 1997), con retrovirus se obtuvo ~10% de eficiencia (Linney y cols., 1999) y con meganucleasa SclI se obtuvo ~30,5% de eficiencia (Thermes y cols., 2002). Por otro lado, utilizando SB se obtuvo un máximo de 31% de eficiencia (Davidson y cols., 2003) y con Tol2 se obtuvo ~ 50% de eficiencia (Kawakami y cols., 2004).

La introducción de promotores específicos de tejido o de genes concretos podría permitir obtener un mayor número de peces transgénicos con algunas características predefinidas (aumento del crecimiento, resistencia a enfermedades, producción de biofarmacéuticos o detección de sustancias tóxicas) (Rocha y cols., 2005; Rocha y cols., 2004; Rocha y cols., 2003).

## **Posible uso de los Tns para identificar genes de importancia para la acuicultura**

---

La identificación de genes importantes para la acuicultura (por ejemplo, aquellos implicados en el crecimiento, conversión de alimento, resistencia a enfermedades, etc), se podría conseguir "etiquetando" con RTIs la línea germinal de las especies objetivo mediante mutagénesis insercional inducida por la transposasa correspondiente. Es decir utilizando un método similar a la inactivación natural con la que el Tol2 provoca el albinismo en medaka (Koga y cols., 1996) e idéntico a la estrategia usada en ratones para detectar oncogenes (Dupuy y cols., 2005) y/o para introducir mutagénesis masiva (Keng y cols., 2005). La mutagénesis insercional se ha aplicado al pez cebra para investigación básica (Davidson y cols., 2003; Kawakami y cols., 2000; Wadman y cols., 2005)

Para aumentar el número de inactivaciones insercionales, las primeras construcciones RTI insertadas en el genoma en una primera generación se pueden activar masivamente mediante la introducción de transposasas exógenas. La inactivación de genes por mutagénesis insercional con RTI resultaría en la obtención de algunos mutantes con la alteración del fenotipo deseado. En este proceso, los genes inactivados están además marcados con las RTI y sus secuencias pueden entonces recuperarse y los genes identificarse (Collier y cols., 2005; Dupuy y cols., 2005). Una vez que los genes implicados se han identificado se podrían utilizar métodos tradicionales de selección genética para obtener líneas con el carácter deseado.

### **Posible uso de los Tns para mejorar la vacunación ADN**

Los Tns de peces podrían también utilizarse para mejorar los vectores utilizados en las vacunas ADN para peces (disminución de la dosis de vacuna, incremento de la duración de la inmunización, etc.) (Coll, 2001; Fernández-Alonso y cols., 2001; Lorenzen y LaPatra, 2005; Lorenzen y cols., 1998; Purcell y cols., 2004; Takano y cols., 2004; Traxler y cols., 1999). Tal y como hemos resumido recientemente, la disminución de las cantidades de ADN necesarias para inmunizar y el aumento de la duración de la inmunización están entre los temas más importantes que mejorarían la aplicación práctica de las vacunas ADN en Acuicultura (Jiménez y cols., 2005).

La existencia en peces de secuencias endógenas relacionadas con los Tns podría influenciar los intentos de inmunización ADN usando Tns para inducir transposición somática. Por ejemplo, en presencia de transposasas activas endógenas, sólo se requeriría la construcción plasmídica RTI para obtener la transposición del ADN exógeno (del gen antigénico). Por otro lado, en presencia de secuencias RTI intactas, la adición de transposasas exógenas podría inducir su excesiva movilización causando algunas inserciones de genes pero también muerte celular. La muerte celular estimularía la inflamación local de los tejidos afectados lo que incrementaría las aparición de defensas celulares locales y aumento de la inmunización de las células (Garver y cols., 2005).

Para mejorar la vacunación ADN en peces con el uso de Tns se necesita una mayor investigación tal y como se viene realizando en nuestros respectivos laboratorios actualmente.

### **Conclusiones**

Ha sido una tarea difícil encontrar secuencias de RTI y transposasas completas en cualquiera de las numerosas copias existentes en vertebrados, debido a que el número de copias incompletas o defectuosas prevalece en los genomas actuales. Sin embargo, se han detectados copias hipotéticamente activas de Tc1 en el pez plano (Tpp1, *Pleuronectes platessa*) (Leaver, 2001) y en la trucha (Tsn1, *Salvelinus namaycush*) (Reed, 1999) y se ha demostrado transposición activa durante la gametogénesis de pez cebra (TE familia Tc1: Tzf, pez cebra) (Lam y cols., 1996) y medaka (TE: Tol2 familia hAT, *Oryzias latipes*) (Koga y cols., 1996). Es decir que existen Tns activos en los peces y parece probable que otros Tns activos se podrían descubrir en el futuro en los genomas de los peces importantes en Acuicultura (Ivics y Izsvak, 2002).

Como un ejemplo de otra estrategia, se ha recuperado un Tns activo de salmónidos mediante reconstrucción sintética. Aunque el SB se ha diseñado para vectores de terapia génica en humanos (transformación de células somáticas) o para transgénesis

en ratones (transformación de células germinales) se podría también aplicar a los peces (Tabla 2).

Los Tns de peces ofrecen nuevas posibilidades para aumentar el rendimiento en Acuicultura por manipulación de las líneas germinales de las especies comercialmente importantes mediante la generación de un gran número de transgénicos (Davidson y cols., 2003), bien para seleccionar entre estos los que aumenten la producción, resistencia a enfermedades o la obtención de productos biofarmacéuticos (Rocha y cols., 2003) o bien para identificar genes importantes por etiquetación con Tn para después aplicar los métodos de selección genética tradicional. Los Tns también se podrían usar para transposición somática en peces para mejorar la vacunación ADN (Fernandez-Alonso y cols., 2001; Lorenzen y cols., 1998; Purcell y cols., 2004; Takano y cols., 2004; Traxler y cols., 1999). Tanto la disminución de las dosis de vectores necesaria para la inmunización como el aumento de la duración de la respuesta inmune (Coll, 2001; Lorenzen y LaPatra, 2005) se podrían conseguir (Tabla 2).

Por otro lado, además de las secuencias completas de la transposasa e RTI, para que exista transposición son necesarias, la presencia de un promotor en el extremo 5´ y una señal terminadora poly(A) en el extremo 3´. La posibilidad de que las secuencias RTI pudieran contener promotores activos en peces, tal y como sucede en los retrovirus de peces con sus RTL (Hronek y cols., 2004) o en Tol2 con sus RII (Tsutsumi y cols., 2003), no se ha estudiado aún.

El tamaño del Tn y el número endógeno o exógeno de copias existentes o inducidas por genoma haploide parece estar controlado de alguna manera todavía desconocida, ya que existe una correlación inversa entre el tamaño del Tn y el número de copias presente en el genoma (Tabla 1). Es decir, a mayor tamaño de la secuencia entre las RTI, menor número de copias endógenas en el genoma (por ejemplo, hay 10 000 - 100 000 copias de Tns de ~200 pb, 1 000-1 500 copias de Tc1 de ~1 500 pb y 10 copias de Tol2 de 4 700 pb) (Tafalla y cols., 2006).

Además se desconoce cuáles serían los efectos de introducir Tns activos exógenos en especies de peces que tengan Tns activos endógenos. Por ejemplo, ¿la introducción de transposasas exógenas en los genomas de peces estimularía la transposición de los Tns endógenos? ¿causarían daños excesivos en el genoma del pez? Se necesita contestar a estas y a otras muchas preguntas antes de que un sistema dual Tn se pueda aplicar a células germinales (peces transgénicos, identificación de genes) o somáticas (vacunación ADN) de peces importantes en Acuicultura.

## Agradecimientos

---

Este trabajo fue financiado por los proyectos CICYT, AGL2004-07404-02-01/ACU y AGL2005-339-01/ACU y el proyecto CPE03-016-C3, España.

## Bibliografía

---

1. Poulet, F.M., P.R. Bowser y J.W. Casey. (1994). Retroviruses of fish, reptiles and molluscs. En: *The Retroviridae*. J.A. Levy. Plenum Press. New York. 3:1-38
2. Hronek, B.W., A. Meagher, J. Rovnak y S.L. Quackenbush. (2004). Identification and characterization of cis-acting elements residing in the Walleye dermal sarcoma virus promoter. *J. Virol.*, 78:7590-7601
3. Shen, C.H. y L.A. Steiner. (2004). Genome structure and thymic expression of an endogenous retrovirus in zebrafish. *J. Virol.*, 78:899-911
4. Tafalla, C., A. Estepa y J.M. Coll. (2006). Potential use of fish transposons in Aquaculture. *J. Biotechnology*, 123:397-412



5. Lam, W.L., T.S. Lee y W. Gilbert. (1996). Active transposition in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:10870-10875
6. Leaver, M.J. (2001). A family of Tc1-like transposons from the genomes of fishes and frogs: evidence for horizontal transmission. *Gene*, 271:203-214
7. Reed, K.M. (1999). Tc1-like transposable elements in the genome of lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Marine Biotechnology*, 1:60-67
8. Izsvak, Z., Z. Ivics y P.B. Hackett. (1995). Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*). *Molecular General Genetics*, 247:312-322
9. Ivics, Z., Z. Izsvak y P.B. Hackett. (1997). Molecular reconstruction of sleeping beauty, a Tc1-like transposon system from fish and its transposition in human cells. *Cell*, 91:501-510
10. Plasterk, R.H.A., Z. Izsvak y Z. Ivics. (1999). Resident Aliens. The Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *TIG*, 15:326-332
11. Izsvak, Z., Z. Ivics y R.H. Plasterk. (2000). Sleeping beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *Journal Molecular Biology*, 302:93-102
12. Izsvak, Z., D. Khare, J. Behlke, U. Heinemann, R.H. Plasterk y Z. Ivics. (2002). Involvement of a bifunctional, paired like DNA-binding domain and a transpositional enhancer in sleeping beauty transposition. *J. Biol. Chem.*, 277:34581-34588
13. Yant, S.R. y M.A. Kay. (2003). Nonhomologous-end-joining factors regulate DNA repair fidelity during sleeping beauty element transposition in mammalian cells. *Molecular Cellular Biology*, 23:8505-8518
14. Zayed, H., Z. Izsvak, D. Khare, U. Heinemann y Z. Ivics. (2003). The DNA-bending protein HMGB1 is a cellular cofactor of sleeping beauty transposition. *Nucleic Acids Research*, 31:2313-2322
15. Geurts, A.M., Y. Yang, K.J. Clark, G. Liu, Z. Cui, A.J. Dupuy, J.B. Bell, D.A. Largaespada y P.B. Hackett. (2003). Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Molecular Therapy*, 8:108-117
16. Ivics, Z., Z. Izsvak, A. Minter y P.B. Hackett. (1996). Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:5008-5013
17. Yant, S.R., J. Park, Y. Huang, J.G. Mikkelsen y M.A. Kay. (2004). Mutational analysis of the N-terminal DNA-binding domain of sleeping beauty transposase: critical residues for DNA binding and hyperactivity in mammalian cells. *Molecular Cell Biology*, 24:9239-9247
18. Zayed, H., Z. Izsvak, O. Walisko y Z. Ivics. (2004). Development of hyperactive sleeping beauty transposon vectors by mutational analysis. *Molecular Therapy*, 9:292-304
19. Cui, Z., A.M. Geurts, G. Liu, D. Kaufman y P.B. Hackett. (2002). Structure-Function analysis of the inverted terminal repeats of the sleeping beauty transposon. *Journal Molecular Biology*, 318:1221-1235
20. Mikkelsen, J.G., S.R. Yant, L. Meuse, Z. Huang, H. Xu y M.A. Kay. (2003). Helper-independent sleeping beauty transposon-transposase vectors for efficient nonviral gene delivery and persistent gene expression in vivo. *Molecular Therapy*, 8:654-665
21. Collier, L.S., C.M. Carlson, S. Ravimohan, A.J. Dupuy y D.A. Largaespada. (2005). Cancer gene discovery in solid tumours using transposon-based somatic mutagenesis in the mouse. *Nature*, 436:272-276
22. Dupuy, A.J., K. Akagi, D.A. Largaespada, N.G. Copeland y N.A. Jenkins. (2005). Cancer biology: Sleeping Beauty awakens. *Nature*, 436:184-186
23. Dupuy, A.J., K. Clark, C.M. Carlson, S. Fritz, A.E. Davidson, K.M. Markley, K. Finley, C.F. Fletcher, S.C. Ekker, P.B. Hackett, S. Hom y D.A. Largaespada. (2002). Mammalian germline transgenesis by transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:4495-4499
24. Horie, K., K. Yusa, K. Yae, J. Odajima, S.E. Fisher, V.W. Keng, T. Hayakawa, A. Mizuno, G. Kondoh, T. Ijiri, Y. Matsuda, R.H. Plasterk y J. Takeda. (2003). Characterization of sleeping beauty transposition and its application to genetic screening in mice. *Molecular Cell Biology*, 23:9189-9207
25. Masuda, K., S. Yamamoto, M. Endoh y Y. Kaneda. (2004). Transposon-independent increase of transcription by the sleeping beauty transposase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317:796-800
26. Yant, S.R., L. Meuse, W. Chiu, Z. Ivics, Z. Izsvak y M.A. Kay. (2000). Somatic integration and longterm transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nature Genetics*, 25:35-41
27. Yusa, K., J. Takeda y K. Horie. (2004). Enhancement of sleeping beauty transposition by CpG methylation: possible role of heterochromatin formation. *Molecular Cell Biology*, 24:4004-4018
28. Grabher, C., T. Henrich, T. Sasado, A. Arenz, J. Wittbrodt y M. Furutani-Seiki. (2003). Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. *Gene*, 322:57-66
29. Davidson, A.E., D. Balciunas, D. Mohn, J. Shaffer, S. Hermanson, S. Sivasubbu, M.P. Cliff, P.B. Hackett y C. Ekker. (2003). Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the sleeping beauty transposon. *Developmental Biology*, 263:191-202

30. Koga, A., M. Suzuki, H. Inagaki, Y. Bessho y H. Hori. (1996). Transposable element in fish. *Nature*, 383:30
31. Koga, A. y H. Hori. (2000). Detection of de novo insertion of the medaka fish transposable element Tol2. *Genetics*, 156:1243-1247
32. Kawakami, K., K. Imanaka, M. Itoh y M. Taira. (2004a). Excision of the Tol2 transposable element of the medaka fish *Oryzias latipes* in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Gene*, 338:93-98
33. Tsutsumi, M., A. Koga y H. Hori. (2003). Long and short ARNm's transcribed from the medaka fish transposon Tol2 respectively exert positive and negative effects on excision. *Genet. Res. Camb.*, 82:33-40
34. Kawakami, K., A. Shima y N. Kawakami. (2000). Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:11403-11408
35. Kawakami, K., H. Takeda, N. Kawakami, M. Kobayashi, N. Matsuda y M. Mishina. (2004b). A transposon-mediated gene trap approach identifies developmental regulated genes in zebrafish. *Developmental Cell*, 7:133-144
36. Iida, A., A. Tachibana, S. Hamada, H. Hori y A. Koga. (2004). Low transposition frequency of the medaka fish Tol2 element may be due to extranuclear localization of its transposase. *Genes Genetic Syst*, 79:119-124
37. Kawakami, K. y T. Noda. (2004). Transposition of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells. *Genetics*, 166:895-899
38. Koga, A. (2004). Transposition mechanisms and biotechnology applications of the medaka fish Tol2 transposable element. *Advances Biophysics*, 38:161-180
39. Ivics, Z., C.D. Kaufman, H. Zayed, C. Miskey, O. Wallsko y Z. Izsvak. (2004). The sleeping beauty transposable element: evolution, regulation and genetic applications. *Current Issues Molecular Biology*, 6:43-56
40. Miskey, C., Z. Izsvak, K. Kawakami y Z. Ivics. (2005). DNA transposons in vertebrate functional genomics. *Cell Molecular Life Science*, 62:629-641
41. Clark, K.J., A.M. Geurts, J.B. Bell y P. Hackett. (2004). Transposon vectors for gene-trap insertional mutagenesis in vertebrates. *Genesis*, 39:225-233
42. Essner, J.J., R.S. McIvor y P.B. Hackett. (2005). Awakening gene therapy with sleeping beauty transposons. *Current Opinion Pharmacology*, 5:513-519
43. Izsvak, Z. y Z. Ivics. (2003). Sleeping beauty transposition: Biology and applications for molecular therapy. *Molecular Therapy*, 9:147-156
44. Liu, G., E.L. Aronovich, Z. Cui, C.B. Whitley y P.B. Hackett. (2004). Excision of sleeping beauty transposons: parameters and applications to gene therapy. *Journal Gene medicine*, 6:574-583
45. Stuart, G.W., J.R. Vielkind, J.V. McMurray y M. Westerfield. (1990). Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. *Development*, 109:577-584
46. Raz, E., H.G.A.M. vanLuenen, B. Schaerringer, R.H.A. Plasterk y W. Driever. (1997). Transposition of the nematode *Caenorhabditis elegans* Tc3 element in the zebrafish *Danio rerio*. *Current Biology*, 8:82-88
47. Linney, E., N.L. Hardison, B.E., Lonze, S. Lyons y L. DiNapoli. (1999). Transgene expression in zebrafish: a comparison of retroviral vector and DNA injection approaches. *Developmental Biology*, 213:207-216
48. Thermes, V., C. Grabher, F. Ristoratore, F. Bourrat, A. Choulika, J. Wittbrodt y J.S. Joly. (2002). I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech. Development*, 118:91-98
49. Rocha, A., S. Ruiz y J.M. Coll. (2005). Improvement of transfection efficiency of epithelioma papulosum cyprini carp cells by modification of their cell cycle and using an optimal promoter. *Marine Biotechnology*, 6:401-410
50. Rocha, A., S. Ruiz, A. Estepa y J.M. Coll. (2004). Application of inducible and targeted gene-strategies to produce transgenic fish: a review. *Marine Biotechnology*, 6:118-127
51. Rocha, A., S. Ruiz, A. Estepa y J.M. Coll. (2003). Fish as biofactories: inducible genetic systems and gene targeting. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1:3-11
52. Keng, V.W., K. Yae, T. Hayakawa, S. Mizuno, Y. Uno, K. Yusa, C. Kokubu, T. Kinoshita, K. Akagi, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, K. Horie y J. Takeda. (2005). Region-specific saturation germline mutagenesis in mice using the Sleeping Beauty transposon system. *Nat. Methods*, 2:763-769
53. Wadman, S.A., K.J. Clark y P.B. Hackett. (2005). Fishing for answers with transposons. *Marine Biotechnology*, 10.1007/s10126-004-0068-2
54. Coll, J.M. (2001). El transposon SB de salmonidos como vector para transferencia de genes en vertebrados. *Investigaciones Agrarias*, 16:237-244

55. Fernandez-Alonso, M., A. Rocha y J.M. Coll. (2001). DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine*, 19:3067-3075
56. Lorenzen, N. y S.E. LaPatra. (2005). DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. Science Technology Office International Epizooties*, 24:201-213
57. Lorenzen, N., E. Lorenzen, K. Eoner-jensen, J. Heppell, T. Wu y H. Davis. (1998). Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 8:261-270
58. Purcell, M.K., G. Kurath, K.A. Garver, R.P. Herwig y J.R. Winton. (2004). Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 17:447-462
59. Takano, T., A. Iwahori, I. Hirono y T. Aoki. (2004). Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 17:367-374
60. Traxler, G.S., E. Anderson, S. E. LaPatra, J. Richard, B. Shewmaker y G. Kurath. (1999). Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV. *Dis. Aquatic Organ.*, 38:183-190
61. Jimenez, N., J. Coll, A. Estepa y C. Tafalla. (2005). Futuro de las vacunas ADN frente a virus en Acuicultura. *Revista AquaTIC*, 23:20-35. Disponible en URL: <http://www.revistaaquatic.com>
62. Garver, K.A., C.M. Conway, D.G. Elliot y G. Kurath. (2005). Analysis of DNA-vaccinated fish reveals viral antigen in muscle, kidney and thymus and transient histopathological changes. *Marine Biotechnology*, 7(5):540-553
63. Ivics, Z. y Z. Izsvak. (2002). Transposable elements for transgenesis and insertional mutagenesis in vertebrates. A contemporary review of experimental strategies. *Methods in Molecular Biology*, 260:255-276
64. Henikoff, J. (1992). Detection of *Caenorhabditis* transposon homologs in diverse organisms. *New Biologist*, 4:382-388
65. Heierhorst, J., K. Lederis y D. Richter. (1992). Presence of a member of the Tc1-like transposon family from nematodes and *Drosophila* within the vasotocin gene of a primitive vertebrate, the Pacific hagfish *Eptatretus stouti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6798-6802
66. Goodier, J.L. y S.D. Davidson. (1994). Tc1 transposon-like sequences are widely distributed in salmonids. *Journal Molecular Biology*, 241:26-34
67. Radice, A.D., B. Bugaj, D.H. Fitch y S.W. Emmons. (1994). Widespread occurrence of the Tc1 transposon family: Tc1-like transposons from teleost fish. *Molecular General Genetics*, 244:606-612
68. Gottgens, B., L.M. Barton, D. Grafham, M. Vaudin y A.R. Green. (1999). Tdr2, a new zebrafish transposon of the Tc1 family. *Gene*, 239:373-379
69. Capriglione, T., G. Odierna, V. Caputo, A. Canapa y E. Olmo. (2002). Characterization of a Tc1-like transposon in the Antarctic icefish, *Chionodraco hamatus*. *Gene*, 295:193-198
70. Gollin, G., A. Amsterdam, Z. Sun, A. Antonelly, R.M. Nissen y N. Hopkins. (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nature Genetics*, 31:135-140
71. Balciunas, D., A.E. Davidson, S. Sivasubbu, S.B. Hermanson, Z. Welle y S.C. Ekker. (2004). Enhancer trapping in zebrafish using the sleeping beauty transposon. *BMC Genomics*, 5:62-63
72. Westerfield, M., J. Wegner, B.G. Jegalian, E.M. DeRobertis y A.W. Puschel. (1992). Specific activation of mammalian Hox promoters in mosaic transgenic zebrafish. *Genes Development*, 6:591-598
73. Yoshida, M., T. Yagi, Y. Furuta, K. Takayanagi, R. Kominami, N. Takeda, T. Tokunaga, J. Chiba, Y. Ikawa y S. Aizawa. (1995). A new strategy of gene trapping in ES cells using RACE. *Transgenic Research*, 4:277-287
74. Zambrowicz, B.P., G.A. Friedrich, E.C. Buxton, S.L. Lilleberg, C. Person y A.T. Sands. (1998). Disruption and sequence identification of 2000 genes in mouse embryonic cells. *Nature*, 392:608-611
75. Hackett, P.B. y M.C. Alvarez. (2000). The molecular genetics of transgenic fish. Recent advances in Marine Biotechnology, 4: *Aquaculture*. part B Fishes:77-145