

El Transposón SB de salmónidos como vector para transferencia de genes en vertebrados

J. M. Coll

Dpto. Biotecnología. SGIT-INIA. Ctra. La Coruña, Km 7. Madrid (España)

coll@inia.es

RESUMEN

Este trabajo es una descripción-revisión del uso de los transposones de salmonidos para transferencia genética en vertebrados. Los transposones son secuencias DNA móviles del genoma que se encuentran entre las secuencias repetidas y que están distribuidos entre animales, bacterias y plantas con secuencias diferentes. Los transposones de vertebrados de la familia Tc1/mariner tienen de unas 1.300 a 2.400 pares de bases (pb) de longitud. Como mínimo contienen un gen único que codifica la enzima transposasa flanqueada por 2 repeticiones terminales invertidas (*tir*) de unas 250 pb. Cada una de las *tir* poseen uno o varios sitios de 20-30 pb de interacción con la transposasa. La transposasa interacciona con estos sitios para cortar el transposón, luego interacciona con secuencias presentes en el genoma en otro locus y pega el transposón en el nuevo locus. En vertebrados todos los transposones que se han detectado están inactivados por mutaciones. Sin embargo, recientemente se ha obtenido un transposon activo de salmónidos mediante mutagénesis dirigida. Dicho transposon denominado «bella durmiente» o «sleeping beauty» (SB) se puede usar en todos los vertebrados analizados hasta el momento como vehículo para incorporar nuevos genes en 1.000 sitios por genoma y para inactivar genes en el genoma por inserción. Además se podría usar como marcador para el mapeo de genes. Es muy posible que se vayan descubriendo más elementos de este tipo en vertebrados con nuevas aplicaciones prácticas para manipular sus genomas.

PALABRAS CLAVE: Transposones
Vectores
Transgénicos
Vertebrados

INTRODUCCIÓN

Este trabajo está enfocado a una descripción-revisión sobre la aplicación de los transposones como vectores en la transferencia génica de vertebrados haciendo hincapié en la reconstrucción del transposón «sleeping beauty» (SB) o bella durmiente en salmónidos y

Recibido: 16-1-01

Aceptado para su publicación: 28-5-01

Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. Vol. 16 (2), 2001

su uso como vector en células de vertebrados. Los transposones son secuencias móviles del genoma capaces de transportarse ellos mismos a otras localizaciones dentro del genoma. Se encuentran tanto en procariontes como en eucariontes.

Localización de los transposones en el genoma de los vertebrados

El experimento clásico de cinética de renaturalización de genomas desnaturalizados confirma que sólo contienen aproximadamente un 10 % de secuencias únicas o genes (Colosimo *et al.*, 2000). El resto del genoma está formado por un 50 % de secuencias repetidas unas 1.000 veces (aquí se encuentran entre otros los transposones, los rRNA y los tRNA), un 20 % de secuencias repetidas unas 100.000 veces (DNA estructural o satélite que forma los centrómeros y los telómeros de los cromosomas) y un 20 % de secuencias palindrómicas (Crollius *et al.*, 2000; Izsvak *et al.*, 2000). Los transposones o elementos móviles forman parte de las secuencias que se encuentran repetidas unas 1.000 veces por genoma. Existen varias familias de transposones con características moleculares diferentes (Sherratt, 1995), pero en este trabajo nos centraremos únicamente en el transposon SB de la familia Tc1/mariner.

Los transposones inactivos de vertebrados

Nunca se ha aislado un transposon de vertebrados activo debido a que aunque están presentes, contienen muchas mutaciones que los inactivan (Ivics *et al.*, 1996; Lam *et al.*, 1996; Raz *et al.*, 1997), lo cual es lógico, ya que la presencia de transposones activos tendría consecuencias funestas para la estabilidad de los genomas. Hasta ahora se han detectado varias familias de elementos móviles o transposones tales como el Tc1/mariner (Avancini *et al.*, 1996), el mermaid (Shimoda *et al.*, 1996), los elementos DANA (Izsvak *et al.*, 1996), los Tol2 (Ac-like) (Kawakami y Shima, 1999; Kawakami *et al.*, 2000), los Tdr2 (Gottens *et al.*, 1999), Tc3 (Raz *et al.*, 1997), etc. Se han caracterizado varios transposones semejantes al Tc1/mariner en pez cebra (*Danio rerio*) (Ivics *et al.*, 1996; Ivics *et al.*, 1996; Izsvak *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1996), trucha y salmón (Radice *et al.*, 1994). Es muy posible que con el tiempo se vayan descubriendo y caracterizando muchos más.

Los genes de las transposasas presentes en los transposones detectados, varían de longitud, por ejemplo, Himar1 (1291 bp), Tc1 (1612 bp), Tc3 (2335 bp), SB (1639 bp), Bari 1 (1639 bp), Pogo (2417 bp), etc. Las repeticiones terminales invertidas (*tir*) también varían en el tamaño y en los sitios de unión a la transposasa. Por ejemplo: Himar 1 (31 pb con un sitio de ligamiento de transposasa de 28 pb), Tc1 (54 pb con un sitio de ligamiento de transposasa de 28 pb), Tc3 (462 pb con 2 sitios de ligamiento de transposasa de 33 pb), SB (225 pb con 2 sitios de ligamiento de transposasa de 30 pb), Bari 1 (26 pb con 1 sitio de ligamiento de transposasa), Pogo (26 pb con 1 sitio de ligamiento de transposasa de 12 pb), etc (Plasterk *et al.*, 1999).

Los transposones de la familia Tc1/mariner, contienen el gen de la enzima transposasa de unos 1.500-2400 pb flanqueada por secuencias con repeticiones terminales invertidas de 200-250 pb con sitios de unión para la transposasa de 20-30 pb (Fig. 1). Estructuras muy similares están presentes en transposones de la misma familia estudiados en in-

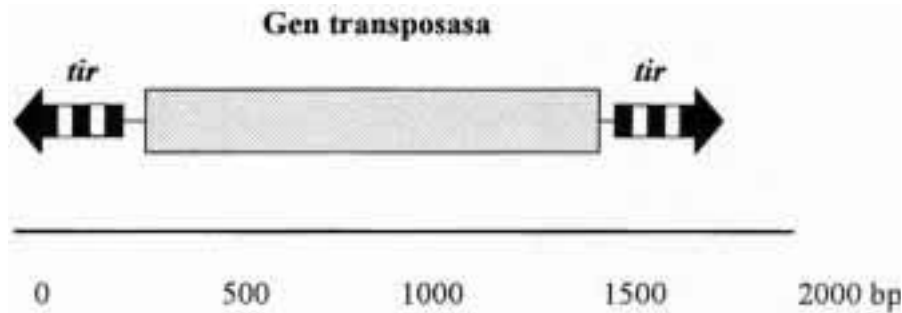


Fig. 1.—Esquema de un transposon SB

Un transposon SB consta de un único gen que codifica la enzima transposasa (■) flanqueado por dos secuencias diez veces más cortas y con repeticiones terminales invertidas (*tir*).

sectos, peces (Izsvak *et al.*, 1997; Weinberg, 1998) y otros vertebrados, sin embargo no hay conservación de sus secuencias DNA (Izsvak *et al.*, 1995).

Uso de los transposones como vectores: «Sleeping Beauty» (SB)

Los transposones bacterianos son bien conocidos desde hace tiempo e incluso se han comercializado kits que utilizan el transposon EZ::Tn (Epicentre, Madison, WI, USA). Estos kits permiten realizar *in vitro* inserciones del transposon en plásmidos diana. Para ello se incubaba el plásmido diana con un transposon que contiene el gen de interés en el lugar de la transposasa y con la enzima transposasa. También se pueden utilizar para generar «knock-outs» por inserción en el genoma de células vivas transfiriendo el transposon completo por electroporación a células *in vitro*.

Los transposones han sido también muy útiles como vectores transgénicos y como mutágenos por inserción en la mosca *Drosophila* y el gusano *Caenorhabditis* donde se conocen versiones activas de transposones endógenos.

Sin embargo para vertebrados, hasta ahora sólo se han podido utilizar los retrovirus como vectores y/o mutágenos. En concreto se están usando retrovirus (pseudotipos) que contienen la glicoproteína G del rabdovirus VSV para mutagénesis insercional (Gaiano y Hopkins, 1996) como vectores (Burns *et al.*, 1993). Ahora bien, existen algunas dificultades para utilizar retrovirus como vectores. i) es necesario que estén a concentraciones muy altas. ii) sólo puede acomodar una longitud limitada de DNA, y iii) pueden infectar al experimentador, por lo que hay que manejarlos en condiciones de alta seguridad. Es por todo ello que el uso de transposones como vectores en vertebrados ofrecería una alternativa con algunas ventajas sobre los retrovirus.

Para ser útiles como vectores en vertebrados, los transposones deberían ser capaces de incorporar segmentos de DNA de varias Kb para poder contener genes enteros y además retener la capacidad de poder ser movilizados por la transposasa (Izsvak *et al.*, 1997). Otros requerimientos que necesita un vector transposon son: facilidad de uso, amplio ran-

go de huéspedes, integración eficiente en los cromosomas y una vez insertado, mantenimiento estable a través de varias generaciones (Ivics *et al.*, 1999).

Sin embargo todos los transposones de vertebrados que se conocen hasta ahora se encuentran inactivados, tal y como hemos mencionado anteriormente. La inhibición de las transposiciones puede deberse a factores celulares externos o a factores intrínsecos al transposon (mutaciones en la transposasa o en las *tir*). Para obtener un transposon activo habría que reparar sus mutaciones. Ahora bien, si por ejemplo, se reparan las mutaciones del transposon y este se introduce en un genoma, debido a que los transposones y sus secuencias *tir* están presentes en miles de copias en el genoma (Izsvak *et al.*, 1998), se causaría una transposición masiva lo que conllevaría a una inestabilidad genética y por lo tanto a una interferencia con los objetivos experimentales. Una solución a este problema es el diseñar un sistema disociado de transposones, es decir separar el gen de la transposasa de las *tir* (Fig. 2) y heterólogo, en el que la intervención del huésped sea mínima.

Para solucionar el problema de la inactivación de los transposones de vertebrados, se ha procedido a repararlos. Comparando secuencias de transposones filogenéticamente semejantes y utilizando mutagenesis dirigida se ha reconstruido un transposon activo a partir de elementos móviles inactivos aislados del salmón (Goodier y Davidson, 1994; Ivics *et al.*, 1997). A este transposon reparado se le ha denominado «bella durmiente» o «sleeping beauty» (SB). Se ha demostrado que SB es funcional en líneas celulares tanto de peces como de ratones y humanos y que es capaz de integración estable y expresión a largo plazo en ratones (Yant *et al.*, 2000). Además se ha demostrado que SB es capaz de transferir genes (Raz *et al.*, 1997). En principio, se podría también utilizar en vertebrados para técnicas de mutagénesis por inserción, para mapeo de genes y para atrapamiento de promotores.

SB es el único transposon basado en DNA de origen vertebrado que puede usarse por ahora para la manipulación experimental. Este transposón se ha utilizado como un instrumento para investigar los requerimientos en cis y en trans para la movilización de estos elementos y los mecanismos que regulan la transposición en las especies de vertebrados (Izsvak *et al.*, 2000). Es por ello y a modo de ejemplo que se va a describir a continuación su proceso de transposición en detalle.

Mecanismo de la transposición en SB

La transposición del transposon SB requiere, al menos dos sitios de ligamiento dentro de las *tir* tal y como demuestran la mutación o la delección de dichas secuencias (Izsvak *et al.*, 2000). La transposasa reconoce y se une a las *tir* para cortar el elemento móvil y pegarlo en otro lugar del genoma (cortar y pegar). El corte ocurre en las dos cadenas de DNA y en las 2 *tir*, de tal forma, que al cortar las dos cadenas dejan una huella en el genoma de 2-3 bases. Por ejemplo, la mayoría de los transposones Tc1/mariner se integran en la secuencia TA reconociendo las secuencias y quizá la estructura del DNA que flanquea estas secuencias. Durante la integración del transposon cortado ocurren otros dos cortes que dejan secuencias AT y TA en cada una de las cadenas del sitio de integración. Al incorporarse el transposon a continuación de estas secuencias se producen dos sitios AT flanqueando el elemento móvil transpuesto (Plasterk *et al.*, 1999). Aun así el transposon se integra también al azar en el genoma. Los sitios de integración varían mucho según el tipo y especie celular del 17,4 al 89,7 % específica.

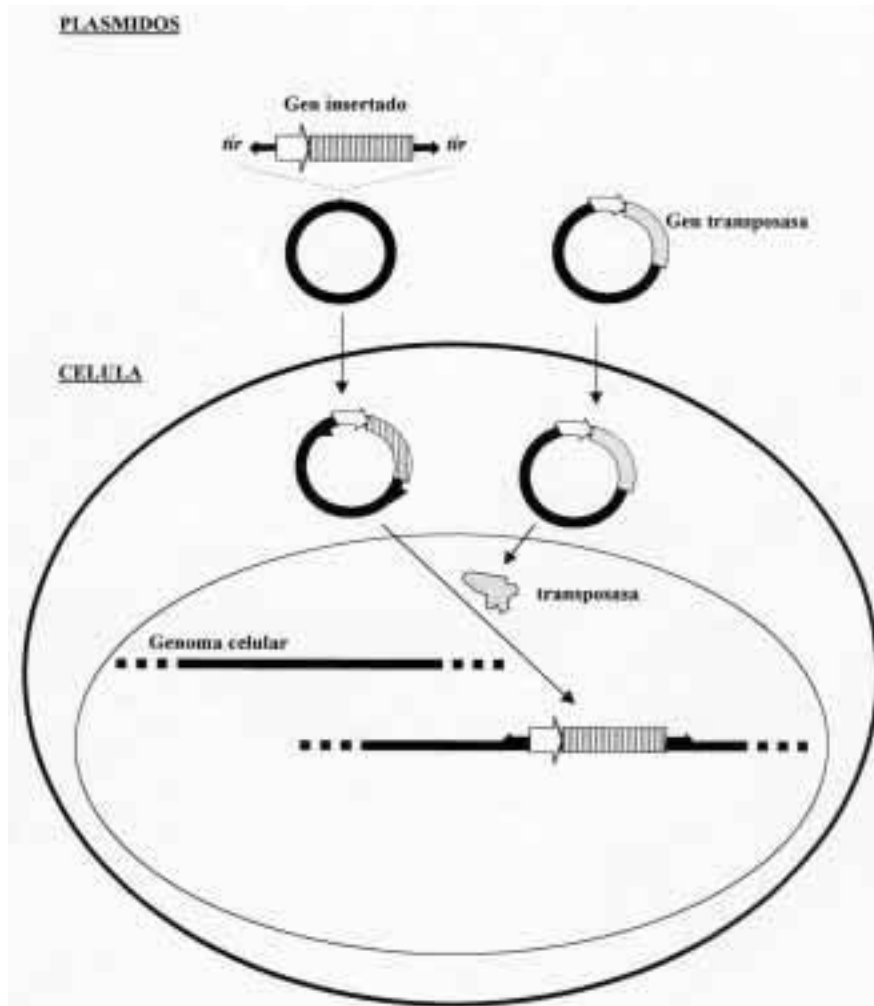


Fig. 2.—Esquema de un procedimiento para integrar genes en células usando transposones

El sistema requiere: un plásmido con el gen de la transposasa (■) y un plásmido con el gen/es inserto/s (▨) flanqueados por las secuencias *tir*. Los dos plásmidos conteniendo cada una de estas dos partes por separado se contrasfectan en una célula. La transposasa bajo el control de un promotor universal (—, promotor de citomegalovirus CMV, por ejemplo) se expresa, corta enzimáticamente las *tir* del otro plásmido y después integra las *tir* + gen/es insertos en los nuevos sitios en el genoma. Si además del gen de interés se incluye un gen de resistencia a antibióticos con su promotor (—) correspondiente (el gen *neo*, por ejemplo), al seleccionar por resistencia al antibiótico G418, se obtendrán células con el gen inserto integrado en su genoma. Al perderse el plásmido de la transposasa a través de las divisiones celulares, la integración del gen entre las *tir* será estable. Mediante este método se ha podido integrar el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y detectar su expresión en las generaciones parental y primera generación (F0 y F1) en el pez cebra (Raz *et al.*, 1997)

Se han podido identificar tres dominios funcionales en la transposasa del SB. Existe una región con señales de localización nuclear (nuclear localization signal, NLS) en los aa 105-120 y regiones de hélices (leucine-zipper) en las zonas de unión al DNA en los aa 8-110 (Ivics *et al.*, 1996). Un tercer dominio es el catalítico o motivo DDE (aa 146-290) que se encuentra en todas las transposasas y recombinasas (Plasterk *et al.*, 1999). En cuanto a la regulación de su actividad, no parece que el aumento de expresión de la transposasa de SB inhiba su transposición tal y como ocurre en otros transposones (Izsvak *et al.*, 2000).

SB puede transformar un rango amplio de células de vertebrados desde peces hasta humanas (Weinberg, 1998). Usando distintos ensayos se han podido detectar hasta 10.000 inserciones independientes por célula en un experimento de transfección, pero la cantidad de transposición que estimula la transposasa SB varía entre diferentes líneas celulares. Puesto que en estos ensayos el nivel de transposición es proporcional a la cantidad de transposasa, esta variación puede deberse a la variación de la eficiencia de transfección tanto para los plásmidos con transposasa como para los plásmidos con los genes insertos y con las *tir* (Fig. 2). Puede haber también diferencias en la transcripción-traducción del gen de la transposasa que determinen su concentración final. Además pueden existir factores celulares que afecten la transposición.

El límite de tamaño del gen inserto entre las *tir* no parece ser tan crítico como en los retrovirus. Eso sí, se ha observado que cuanto más grandes son los elementos móviles, menor es su frecuencia de transposición, aunque esto podría ser también una ventaja para su estabilidad una vez insertados. Con cada Kb de aumento de tamaño del gen inserto en el transposon SB (entre 2.2 a 10.3 Kb), se obtiene una disminución exponencial del 30 % en la eficiencia de transposición (Izsvak *et al.*, 2000).

Futuro

Aunque todavía existen algunos problemas con el sistema SB, es indudable que ofrece un método de introducción de DNA que puede dirigirse a localizaciones concretas dentro del genoma. La identificación del locus de integración del gen inserto después de una transposición puede hacerse fácilmente mediante PCR usando oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias de las *tir* e hibridando después las secuencias amplificadas con sondas del gen del inserto. Conforme se vayan descubriendo más elementos móviles potencialmente escondidos en ese casi 50 % del genoma que contiene secuencias repetidas, se tendrán más instrumentos del tipo SB o quizá otros con nuevas propiedades que los hagan más útiles como herramientas de diseño. Además la identificación y estudio de los mecanismos de movilización de estos elementos repetidos pueden hacer avanzar nuestros conocimientos sobre la evolución y cambios en los genomas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a J. Coll P. su mecanografía. Este trabajo fue financiado por los proyectos europeos FAIR CT98-4003 y CT98-4398, por los proyectos FEDER IFD97-467, CICYT ACU01003 e INIA, SC00046.

SUMMARY

The SB transposon of salmonids as a vector for gene transfer in vertebrates

Transposons are variable sequences or mobile elements of the genome that are found among the repeated sequences in the genome and are distributed among animals, bacteria and plants. Those transposons of the Tc1/mariner vertebrates are about 1300 to 2400 base pairs (bp) in length. Minimally they contain a unique gene that encodes the transposase enzyme flanked by two sequences with terminal inverted repeats (tir) of about 250 bp. Each of the tir contains one or several sites of 20 to 30bp in length that interact with the transposase. The transposase interacts with these sites to cut the transposon, then it interacts with sequences present at other loci in the genome and pastes the transposon into the new locus. The transposons described in vertebrates are inactivated because of mutations. However, by multiple site-directed mutagenesis of a fish inactive transposon an active vertebrate transposon has been obtained. This transposon, named «Sleeping beauty» (SB) can be used in vertebrates other than fish as a vehicle to introduce new genes in 1000's of new sites in the genome or to inactivate genomic genes by insertion. Furthermore, it could be used as a label to map new genes. It is possible that new elements of this vector will be discovered that provide new methods to manipulate the genomes.

KEY WORDS: Transposons
Vectors
Transgenics
Vertebrates

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVANCINI R.M., WALDEN K.K., ROBERTSON H.M., 1996. Tc1 family of transposable elements. *Genetica* 98, 131-140.
- BRITTEN R. J., KOHNE D.E., 1968. Repeated sequences in DNA. *Science* 161, 529-540.
- BURNS J.C., FRIEDMAN T., DRIEVER W., BURRASCANO M., YEE J.K., 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 8033-8037.
- COLOSIMO A., GONCZ K.K., HOLMES A.R., KUNZELMANN K., NOVELLI G., MALONE R.W., BENNETT M.J., GRUENERT D.C., 2000. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *BioTechniques* 29, 314-331.
- CROLLIUS H.R., JAILLON O., DASILVA C., OZOUF C.C., FIZAMES C., FISHER C., BOUNEAU L., BILLAULT A., QUETIER F., SAURIN W., BERNOT A., WEISSENBAACH J., 2000. Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Research* 10, 939-949.
- GAIANO N., HOPKINS N., 1996. Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish. *Nature* 383, 829-832.
- GOODIER J.L., DAVIDSON W.S., 1994. Tc1 transposon-like sequences are widely distributed in salmonids. *Journal Molecular Biology* 241, 26-34.
- GOTTENS B., BARTON L.M., GRAHAM D., VAUDIN M., GREEN A.R., 1999. Tdr2, a new zebrafish transposon of the Tc1 family. *Gene* 239, 373-379.
- IVICS Z., IZSVAK Z., HACKETT P.B., 1996. Repeated sequence elements in zebrafish and their use in molecular genetic studies. *Zebrafish Science Monitor* 3, http://zfin.org/zf_info/monitor/vol3.6/3.html.
- IVICS Z., IZSVAK Z., HACKETT P.B., 1997. Molecular reconstruction of sleeping beauty, a Tc1-like transposon system from fish and its transposition in human cells. *Cell* 91, 501-510.

- IVICS Z., IZSVAK Z., HACKETT P.B., 1999. Genetic applications of transposons and other repetitive elements in zebrafish. *Methods in Cell Biology. The Zebrafish: genetics and genomics*. AP ed Detrich H.W. Westerfield M., Zon L.I. 60, 99-131.
- IVICS Z., IZSVAK Z., MINTER A., HACKETT P.B., 1996. Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 5008-5013.
- IZSVAK Z., IVICS Z., GARCÍA-ESTEFANÍA D., FAHRENKRUG S.C., HACKETT P.B., 1996. DANA elements: a family of composite, tRNA-derived short interspersed DNA elements associated with mutational activities in zebrafish (*Danio rerio*). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 1077-1081.
- IZSVAK Z., IVICS Z., HACKETT P.B., 1995. Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*). *Molecular General Genetics* 247, 312-322.
- IZSVAK Z., IVICS Z., HACKETT P.B., 1997. Repetitive elements and their genetic applications in zebrafish. *Biochemical Cell Biology* 75, 507-523.
- IZSVAK Z., IVICS Z., PLASTERK R.H., 2000. Sleeping beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *Journal Molecular Biology* 302, 93-102.
- IZSVAK Z., IVICS Z., SHIMODA N., MOHN D., OKAMOTO H., HACKETT P.B., 1998. Short inverted repeat transposable elements in teleost fish and implications for their mechanism of amplification. *Journal Molecular Evolution* 47, 1-8.
- KAWAKAMI K., SHIMA A., 1999. Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene* 240, 239-244.
- KAWAKAMI K., SHIMA A., KAWAKAMI N., 1999. 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.
- LAM W.L., LEE T.S., GILBERT W., 1996. Active transposition in zebrafish. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 10870-10875.
- PLASTERK R.H.A., IZSVAK Z., IVICS Z., 1999. Resident Aliens. The Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *TIG* 15, 326-332.
- RADICE A.D., BUGAJ B., FITCH D.H., EMMONS S.W., 1994. Widespread occurrence of the Tc1 transposon family: Tc1-like transposons from teleost fish. *Molecular General Genetics* 244, 606-612.
- RAZ E., VANLUENEN H.G.A.M., SCHAEFFER B., PLASTERK R.H.A., DRIEVER W., 1997. Transposition of the nematode *Caenorhabditis elegans* Tc3 element in the zebrafish *Danio rerio*. *Current Biology* 8, 82-88.
- SHERRATT D.J., 1995. Mobile genetic elements. *Frontiers in Molecular Biology*. Eds. B.D. Hames y D.M. Glover. Oxford Univ. Press, N.Y. 179 p.
- SHIMODA N., CHEVRETTE M., EKKER M., KIKUCHI Y., HOTTA Y., OKAMOTO H., 1996. Mermaid: a family of short interdispersed repetitive elements widespread in vertebrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 226-232.
- WEINBERG E.S., 1998. Zebrafish genetics: harnessing horizontal gene transfer. *Current Biology* 8, 244-247.
- YANT S.R., MEUSE L., CHIU W., IVICS Z., IZSVAK Z., KAY M.A., 2000. Somatic integration and longterm transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nature Genetics* 25, 35-41.