

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN DE PECES Y BIOTECNOLOGÍA

INTRODUCCIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE
TRANSFERENCIA GÉNICA EN LUBINA (*Dicentrarchus
labrax*)

ICIAR MUÑOZ FORCADA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 7 de Novembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Daniel Ramón Vidal
- D^a. Carmen Álvarez Herrero
- D^a. Amparo Estepa Pérez
- D. Lluís Montoliu José
- D. Gonzalo Martínez Rodríguez

Va ser dirigida per:

D. Manuel Carrillo Estévez

D^a. Ana Gómez Peris

©Copyright: Servei de Publicacions
Iciar Muñoz Forcada

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6480-5

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ACUICULTURA DE TORRE DE LA SAL
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS**

**INTRODUCCIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE
TRANSFERENCIA GÉNICA EN LUBINA
(*Dicentrarchus labrax*)**

TESIS DOCTORAL

Iciar Muñoz Forcada

2005

Iciar Muñoz Forcada ha sido subvencionada por una beca de Formación de Personal Investigador de la Diputación Provincial de Castellón para la realización de este trabajo

AGRADECIMIENTOS

En este trabajo, me gustaría dejar constancia del agradecimiento que siento hacia aquellas personas que de una manera u otra, han aportado algo para su realización.

Especialmente, me gustaría resaltar las cualidades positivas de las personas que han estado cerca de mí estos años y que me han servido de ayuda:

Muchas gracias,

A mi director de tesis, el Dr. Manuel Carrillo, por su carácter tan afable y por ser capaz de transmitir tanta alegría. Por su inestimable afán de organizar diversos eventos, para que su equipo estuviese más unido.

A mi directora de tesis, la Dra. Ana Gómez, porque es de las pocas personas que he conocido capaz de transmitir sus conocimientos con tanta facilidad y generosidad, una cualidad que yo valoro mucho en un científico.

A la Dra. Silvia Zanuy, porque es una persona muy entregada a su trabajo, y que siempre ha procurado que tuviésemos la financiación suficiente para poder seguir trabajando.

A todo el Departamento de peces, a los que siguen y a los que ya se fueron, porque todos en un momento u otro me han ayudado con algún problemilla o me han resuelto alguna duda. En especial, a mis compañeros de laboratorio y despacho, a los que he echado mucho de menos, gracias por vuestro compañerismo, por las risas y buenos ratos pasados. Especial mención a los habitantes de la Casa dónde tantas fiestas y reuniones hemos tenido.

Al resto de personal científico y laboral del IATS, porque me consta que numerosas veces me han echado una mano, y se han preocupado por mí.

Me gustaría mostrar mi agradecimiento, a aquellas personas que aunque no han participado directamente en la realización de esta tesis doctoral, me han mostrado su apoyo sobre todo en el tiempo de escritura, y corrección de esta tesis. Muchas gracias,

Al Dr. José Luis Campo, con el que he trabajado estos últimos años, por su apoyo, y muy especialmente por ofrecerme alternativas y soluciones cuando he tenido problemas, lo que me ha permitido continuar escribiendo esta tesis con más entusiasmo y tranquilidad. Y a mis compañeras, la Dra. María García y la Dra. Sara García, por su ayuda.

Por su puesto, a mis padres, a mi hermanita, y a toda mi familia y amigos. Especialmente, a mi amiga Ana González por aguantarme y escuchar pacientemente, como ella dice, todos mis rollos con la tesis. A Jorge Ros porque se ha portado excepcionalmente bien conmigo, sobretodo en los momentos más difíciles. A mi tía Rosa Muñoz, que se merece muchísimo más que yo este grado de doctor por preocuparse y cuidarme tanto.

INDICE

Organización de este manuscrito	1
Introducción	5
1.- Biotecnología y acuicultura: peces transgénicos	5
2.- Sistemas inducibles. Sistema de regulación por tetraciclina	20
3.- Transferencia génica somática	33
4.- Líneas celulares de peces: importancia en estudios básicos y en transgénesis	35
5.- Control del ciclo reproductivo en peces	38
Bibliografía	41
Objetivos generales	59
Capítulo 1.- Transferencia génica somática	
1.1.- Inyección y expresión de DNA plasmídico en músculo de lubina	63
1.1.1.- Introducción	65
1.1.2.- Material y Métodos	67
1.1.3.- Resultados	71
1.1.4.- Discusión	80
Bibliografía	84
1.2.- Diseño de una gonadotropina de cadena única. Detección en sangre tras inyectar su secuencia en músculo de lubina	89
1.2.1.- Introducción	91
1.2.2.- Material y Métodos	94
1.2.3.- Resultados	101
1.2.4.- Discusión	108
Bibliografía	110

Capítulo 2.- El sistema de regulación por tetraciclina

2.1.- Nuevo método para obtener en un solo paso clones que expresen el sistema de regulación por tetraciclina	115
2.1.1.- Introducción	117
2.1.2.- Material y Métodos	120
2.1.3.- Resultados	123
2.1.4.- Discusión	129
Bibliografía	132
2.2.- Experimentos <i>in vitro</i> . Regulación de la expresión de genes exógenos en células de pez: evaluación de diferentes versiones del sistema de regulación por tetraciclina	137
2.2.1.- Introducción	139
2.2.2.- Material y Métodos	142
2.2.3.- Resultados y Discusión	145
2.2.4.- Conclusiones	160
Bibliografía	161
2.3.- Experimentos <i>in vivo</i> . Evaluación de diferentes versiones del sistema de regulación por tetraciclina en peces	165
2.3.1.- Introducción	167
2.3.2.- Material y Métodos	169
2.3.3.- Resultados y Discusión	171
2.3.4.- Conclusiones	178
Bibliografía	178

Capítulo 3.- Modelos *in vitro* para el estudio de la lubina

3.- Evaluación de una línea celular de lubina para su uso en aplicaciones biotecnológicas	185
3.1.- Introducción	187
3.2.- Material y Métodos	188
3.3.- Resultados	191
3.4.- Discusión	201
Bibliografía	204

Discusión y conclusiones

Discusión general	211
Conclusiones	217

ORGANIZACIÓN DE ESTE MANUSCRITO

Este trabajo de tesis doctoral se inicia con una introducción general, y posteriormente se enumeran los objetivos. Los resultados obtenidos en los distintos experimentos se agrupan, en base a una temática común, en tres capítulos diferentes, que contemplan distintos aspectos de la metodología de la transferencia génica en peces. Cada capítulo contiene a su vez varios subcapítulos, desarrollados con la estructura propia de un artículo de investigación, donde se explican y discuten los resultados obtenidos, así como la metodología empleada. Por último, se recogen una discusión general, y las conclusiones generales de la tesis. Mediante esta organización se ha pretendido dotar de independencia a cada uno de los subcapítulos, para que puedan ser comprendidos al leerse de forma separada. Por esta razón, inevitablemente, se incluye en algunos casos información repetida o redundante.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- BIOTECNOLOGÍA Y ACUICULTURA: PECES TRANSGÉNICOS

La biotecnología en la pesca y la acuicultura comprende una vasta gama de tecnologías que ofrecen diferentes posibilidades como, elevar la tasa de crecimiento de las especies cultivadas, aumentar el valor nutricional de los piensos compuestos para peces, mejorar la salud de los peces, ayudar a restablecer y proteger los entornos acuáticos, ampliar la gama de especies acuáticas cultivadas, y mejorar la gestión y conservación de las poblaciones silvestres. El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) define la biotecnología como: “*toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos*” (www.fao.org/biotech/stat.asp, Declaración de la FAO sobre biotecnología). Por otra parte, la acuicultura se puede definir como “*la propagación y cultivo de organismos acuáticos en condiciones controladas o seleccionadas*”. Ambas disciplinas pueden combinarse, utilizando estrategias biotecnológicas para mejorar algún aspecto del cultivo de los organismos acuáticos.

En los últimos años, se ha realizado un gran esfuerzo para introducir en la acuicultura española nuevas especies de interés comercial y nuevas tecnologías. Sin embargo, la producción con los sistemas actuales de cultivo todavía es ineficiente. Además, ciertos caracteres de interés económico todavía son susceptibles de mejora. Los procedimientos clásicos de mejora genética se han utilizado muy poco en peces (Gjedrem 1998), si lo comparamos con su aplicación en algunas especies ganaderas, y por tanto, cabría esperar un aumento de la productividad por medio de cruces selectivos. No obstante, este tipo de procedimientos son difíciles de llevar a cabo debido a los problemas inherentes al cultivo y manejo de las especies en acuicultura.

Actualmente, existen nuevas técnicas biotecnológicas basadas en la biología molecular y la ingeniería genética, muy usadas en mamíferos, sobre todo en ratón. La introducción de esta tecnología en el sector de la acuicultura podría aportar una mejora en distintos aspectos de la producción. Además, constituiría una herramienta valiosa para estudiar los mecanismos que rigen la fisiología de las especies acuáticas que se pretenden cultivar. Por último, es necesario adaptar y mejorar estas nuevas tecnologías para su uso en peces, con el fin de minimizar riesgos ambientales y costes innecesarios.

1.1.- PECES TRANSGÉNICOS: APLICACIONES

En 1980, se produjo el primer animal transgénico mediante la inyección directa de DNA (ácido desoxirribonucleico) en el pronúcleo de oocitos de ratón (Gordon *et al.* 1980). Se demostró que este DNA exógeno podía integrarse en el genoma y pasar a las nuevas generaciones. Desde entonces, esta técnica ha sido muy utilizada, tanto en ratón como en otras especies de mamíferos. Así, la utilización de ratones transgénicos ha supuesto una revolución en el campo de la investigación biomédica, donde han servido como modelos para estudios de función génica y de diversas patologías. Por otra parte, también se ha aplicado esta tecnología a distintas facetas de la producción animal entre las que destacan la protección frente a enfermedades, la producción de proteínas de alto valor biológico, o la mejora de funciones biológicas importantes para el cultivo como por ejemplo, la tasa de crecimiento (Maclean 2003).

En estudios básicos relacionados con biomedicina está cada vez más extendida la utilización de peces transgénicos, utilizando principalmente especies modelo como el pez cebra (*Danio rerio*) o la medaka (*Oryzias latipes*) (Wakamatsu *et al.* 2001; Wittbrodt *et al.* 2002; Langenau *et al.* 2003; Langenau & Zon 2005; Winnemoeller *et al.* 2005). También se han realizado estudios para conocer la función o la regulación de genes relacionados directa o indirectamente con la producción. Para ello se han utilizado tanto especies modelo como comerciales (Ogino *et al.* 1999; Hew *et al.* 1999b; Yoshizaki *et al.* 2000; Wang *et al.* 2002; Muller *et al.* 2002; Xu *et al.* 2003).

Por otra parte, las aportaciones que la transferencia génica puede hacer a la acuicultura están relacionadas con la introducción de caracteres nuevos y la mejora de

caracteres de interés económico: talla, peso, índice de conversión. A continuación se describen las áreas donde los avances han sido más significativos. Todas ellas se encuentran en distintas etapas de desarrollo.

Transferencia del gen de la hormona de crecimiento en peces

El primer trabajo en el que se introdujo una copia exógena del gen de la hormona de crecimiento (GH) en un animal fue realizado en ratón (Palmiter *et al.* 1982). Se observó que la expresión de copias extra de este gen producía un aumento extraordinario del crecimiento. Este trabajo significó el punto de partida para la realización de este tipo de aplicaciones en especies ganaderas. La utilización de esta aproximación en especies de peces cultivadas pretende un aumento en la tasa de crecimiento en las primeras fases del desarrollo, con el fin de conseguir ejemplares adultos de mayor talla e índice de conversión. Se ha aplicado esta técnica en varias especies comerciales, como por ejemplo: trucha arcoiris, salmón atlántico y pacífico, carpa, tilapia y pez gato.

Los primeros resultados en peces, aunque variados, resultaron prometedores. En algunos casos, se ha conseguido aumentar el peso hasta seis veces, frente a un aumento de dos veces conseguido en ratón (Du *et al.* 1992b).

En los primeros experimentos realizados en peces se usó el gen de la GH de origen humano o murino, y promotores de origen vírico o provenientes de mamíferos; pues no se disponía de secuencias de origen piscícola. La mayoría de estas construcciones no fueron capaces de aumentar la tasa de crecimiento.

Posteriormente, se han utilizado construcciones con secuencias procedentes de pez. Con ellas se han obtenido mayores niveles de expresión y una regulación mejor del gen introducido; además tendrían una mejor aceptación pública (Liu *et al.* 1990). Du y colaboradores (1992b) fueron los primeros en demostrar que era posible conseguir un incremento importante del crecimiento en peces. Utilizaron una construcción que contenía el promotor y las secuencias de poliadenilación de la proteína anticongelante (AFP) de la babosa vivípara americana, (*Macrozoarces americanus* L.), unidas al cDNA (DNA complementario) de la GH de salmón pacífico

(*Oncorhynchus tshawytscha*) (Du *et al.* 1992a; Devlin *et al.* 1995). Esta construcción se transfirió por microinyección a huevos recién fecundados de salmón atlántico. Como media, se obtuvo un aumento de peso de dos a seis veces en los animales transgénicos respecto a los controles, llegando a obtenerse ejemplares trece veces mayores (Du *et al.* 1992b). El uso del promotor del gen AFP tiene ventajas importantes. Primero, este gen se expresa predominantemente en el hígado (Gong *et al.* 1996), un órgano con gran capacidad de síntesis y secreción. Segundo, el gen AFP sólo está presente en algunas especies de peces, con lo que no interfiere con el metabolismo endógeno de aquellas especies que no lo poseen. Tercero, se puede aprovechar la existencia de elementos reguladores encontrados en el promotor AFP para modular la expresión según distintas necesidades (Gong *et al.* 1991; Gong *et al.* 1996). Otros promotores que se han utilizado para dirigir la expresión de GH en peces son, el promotor de la metalotionina de salmón (Cavari *et al.* 1993), el promotor de la histona H3 de salmónidos (Chan & Devlin 1993), y el promotor de la actina β de carpa (Moav *et al.* 1993).

En general, el efecto de la expresión de copias adicionales del gen de la GH sobre el crecimiento, parece más espectacular en salmónidos que en otras especies de peces. Sin embargo, en tilapia (*Oreochromis niloticus*), se han obtenido respuestas óptimas en crecimiento tras la transferencia del gen de la GH. La introducción de una construcción basada en el cDNA de la GH de tilapia, bajo el control del promotor del citomegalovirus (pCMV), aportaba un incremento del 82% en peso en la primera generación de tilapias transgénicas (Martinez *et al.* 1996). Otros autores, usando una construcción de origen piscícola, consiguieron aumentar la talla de las tilapias transgénicas tres veces respecto a los controles. Esta construcción contenía el promotor AFP de la babosa vivípara americana, y la secuencia codificante de la GH procedente de salmón pacífico (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Rahman *et al.* 1998).

Los peces transgénicos para GH también parecen ser buenos candidatos a tener índices de conversión mejorados, conservando sus características organolépticas (Rahman *et al.* 1998; Krasnov *et al.* 1999).

Partiendo de ejemplares salvajes, y a través de técnicas clásicas de mejora genética, también se puede conseguir un mayor índice de crecimiento. De hecho, la transgénesis en peces previamente domesticados, y seleccionados para un mayor crecimiento, puede no resultar útil en algunos casos (Devlin *et al.* 2001). Ver fig 1.1.

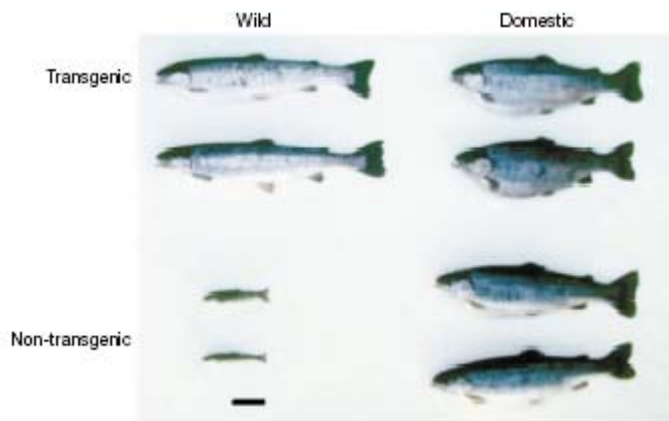


Fig 1.1.- Efecto de la transferencia del gen de la GH en truchas domesticadas y salvajes. Únicamente las truchas salvajes aumentan de tamaño cuando se introduce el gen de la GH.

(Devlin *et al.* 2001)

Un inconveniente de la metodología clásica de mejora genética, es que permite mejorar solamente caracteres previamente existentes en una especie. Sin embargo, la transgénesis permite introducir características distintas de las propias de la especie. Con este objetivo, se han acometido las aproximaciones, que se describen a continuación:

Peces resistentes al frío

Existen especies de peces que, de forma natural, son capaces de sobrevivir en aguas que pueden llegar a temperaturas de $-1.9\text{ }^{\circ}\text{C}$, gracias a las proteínas anticongelantes (AFPs) y las glicoproteínas anticongelantes (AFGPs). Estas proteínas interactúan con los cristales de hielo uniéndose a ellos e impidiendo su crecimiento, y son capaces de bajar la temperatura de congelación del organismo (Ewart *et al.* 1999). El desarrollo de peces transgénicos capaces de vivir en aguas frías es interesante, ya que se podría ampliar el cultivo de especies como el salmón a latitudes más extremas. Así, se introdujo el gen de una AFP de tipo I del falso fletán del Canadá, (*Pseudopleuronectes americanus*), en salmón atlántico (*Salmo salar*), demostrando que éste se

integraba en el genoma del pez, y se transmitía a las generaciones sucesivas (Fletcher *et al.* 1988). Sin embargo, la expresión de este gen no confería resistencia a la congelación a los animales que lo habían incorporado. Esto puede deberse al hecho de que el salmón carece de las enzimas necesarias para la maduración del transcrito de la AFP (Hew *et al.* 1999a). Otra posible causa es una expresión del gen demasiado baja para conferir resistencia al frío, ya que éste está presente en copia única en los salmones transgénicos, mientras que en el falso fletán los genes AFP se encuentran en multicopia. En la especie modelo pez rojo (*Carassius auratus*) se ha introducido un gen de la AFP de tipo III, procedente de la babosa vivípara americana, que codifica la proteína madura (Wang *et al.* 1995). La proteína AFP madura se expresaba en las generaciones F1 y F2, confiriendo a estos peces transgénicos una mayor tolerancia al frío.

Modificaciones en el metabolismo

Una de las aplicaciones de la transgénesis ha ido encaminada a modificar el metabolismo digestivo, para que los peces puedan aprovechar mejor los hidratos de carbono procedentes de plantas. Con este fin, se han transferido los genes del transportador de la glucosa tipo 1 humano, y la hexoquinasa tipo 2 de rata, a dos especies de salmónidos (Pitkanen *et al.* 1999). Desafortunadamente, no se pudo obtener una evidencia directa de la funcionalidad de estos genes para mejorar el metabolismo de los hidratos de carbono en estos peces. De una forma similar, se ha pretendido mejorar el metabolismo del fósforo en peces. La mayoría del fósforo que contienen las semillas incluidas en los piensos de alimentación para animales se encuentra en forma de fitato, el cual es indigerible excepto para los animales rumiantes. El fósforo es necesario para el crecimiento, y para aportarlo en la dieta, los piensos deben enriquecerse de forma artificial con fósforo inorgánico, lo que encarece su producción enormemente. Por otro lado, el fósforo, al ser excretado, se convierte en un elemento contaminante importante. El gen de la fitasa, aislado del hongo filamentoso *Aspergillus niger* y transferido a medaka, podría servir para que estos peces utilicen

directamente el fitato de las plantas como fuente de fósforo (Hostetler *et al.* 2004) (http://www.ansc.purdue.edu/faculty/muir_r.htm).

Peces resistentes a enfermedades

Las condiciones de hacinamiento utilizadas en el cultivo intensivo de peces hacen que éstos sean susceptibles de padecer distintas enfermedades originadas por virus, bacterias, protozoos u hongos. Se han propuesto diversas estrategias para abordar este problema utilizando técnicas de transferencia génica.

Se han desarrollado vacunas de DNA eficientes contra ciertos virus patógenos, como el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) (Lorenzen *et al.* 2002; Kurath 2005; Biering *et al.* 2005).

Con efectividad sobre un rango amplio de patógenos, se propone utilizar el gen de la lisozima para producir peces transgénicos. La lisozima de trucha es un agente antibacteriano potente contra muchas bacterias *gram*-positivas. Así, se han generado salmones transgénicos conteniendo el cDNA de la lisozima de trucha bajo el control del promotor AFP de la babosa vivípara americana (Hew *et al.* 1995), aunque no se conoce de momento si esta estrategia ha sido efectiva.

De la misma manera se ha utilizado el gen de la cecropina de la polilla de la seda para generar bagres de canal (*Ictalurus punctatus*) (Dunham *et al.* 2002) y medakas transgénicas (Sarmasik *et al.* 2002). Las cecropinas son pequeños péptidos catiónicos con un amplio espectro antimicrobiano que poseen algunos insectos. Además, no son tóxicos para eucariotas, ya que algunos mamíferos como el cerdo también los poseen. La exposición de estos peces transgénicos a la acción de distintas bacterias patógenas para peces, demostró que la expresión de cecropinas confería un aumento de la resistencia a la infección bacteriana.

Otras estrategias, aún sin desarrollar, que proponen atacar dianas más específicas son, la aplicación de la técnica del RNA (ácido ribonucleico) antisentido, y el uso de ribozimas para bloquear la acción o destruir RNAs virales (Chen *et al.* 2000). La expresión de proteínas de cubierta de virus, como la proteína G del virus de la

necrosis hematopoyética del salmón (IHNV), puede servir para bloquear los sitios de unión al receptor, y de esta manera, competir con los virus que de forma normal se unen a estos receptores. Por último, también se propone la transferencia y expresión de genes implicados en la defensa inmunitaria, como son los interferones y las citoquinas, para de esta manera estimular el sistema inmunitario.

Actualmente, los genes y proteínas implicados en muchas enfermedades apenas se conocen, ni están caracterizados. A medida que se identifiquen estos genes habrá posibilidades de usar nuevas estrategias biotecnológicas para combatir estas enfermedades.

Peces transgénicos y toxicología ambiental

Los peces transgénicos pueden servir como sistemas de detección de contaminantes en el agua. Existen líneas de pez cebra que contienen un gen indicador, normalmente el de la proteína verde fluorescente (*GFP*) o la luciferasa de luciernaga (*luc*), cuya expresión está bajo el control de un elemento inducible por algún contaminante del agua (Macleán 1998; Carvan, III *et al.* 2000; Carvan, III *et al.* 2001; Mayer *et al.* 2003). Así, se han utilizado promotores de choque térmico, promotores que responden a metales pesados, o a hidrocarburos aromáticos.

Otra aproximación, en el área de la toxicología ambiental, son las líneas de peces transgénicos pensadas para valorar el poder mutagénico de algunos compuestos químicos y contaminantes del agua (Amanuma *et al.* 2000; Winn *et al.* 2000; Winn *et al.* 2001; Winn 2001). Estos peces contienen en su genoma un gen que actúa como diana mutacional. El gen diana se separa posteriormente del DNA genómico, y se transfiere a un sistema bacteriano especializado para cuantificar las mutaciones.

Peces como biofactorías

Aunque no se han conseguido todavía resultados significativos en este campo, la utilización de peces transgénicos para producir proteínas con interés terapéutico o industrial ampliaría considerablemente las aplicaciones e intereses de la acuicultura.

Los peces presentan ciertas ventajas respecto a otros animales, sobre todo mamíferos, para su uso como biofactorías: un desarrollo rápido, bajo coste de producción, y la ausencia de riesgo de transferencia de retrovirus o de priones. Algunos autores indican que el músculo del pez cebra puede utilizarse eficientemente como biorreactor (Gong *et al.* 2003). Maclean y colaboradores están trabajando con tilapias transgénicas para la producción del factor VII de coagulación humano (Hwang *et al.* 2004), y su posterior purificación a partir de músculo.

Control del ciclo reproductivo

La generación de peces transgénicos utilizando genes implicados en el ciclo reproductivo tiene dos objetivos distintos. Por un lado, la obtención de animales estériles, que pueden resultar de interés comercial y que además, ofrecen una mayor seguridad (ver apartado 1.3). Por otro lado, conseguir un control mayor de los ciclos de puesta y la maduración sexual (este punto se ampliará en el apartado 5).

A pesar de que la mayoría de las aplicaciones descritas están en fase de desarrollo, los primeros animales transgénicos comercializados han sido peces. La empresa GloFishTM comercializa peces cebra (*Danio rerio*) transgénicos que contienen distintas variantes del gen de la GFP. Expuestos a la luz adecuada, éstos pueden verse de diferentes colores. Estos peces se comercializan como peces ornamentales no destinados al consumo humano.



Fig 1.2.- Peces cebra transgénicos comercializados por GloFish™

Procedencia de la foto:
www.glofish.com

El salmón atlántico transgénico conteniendo la GH del salmón pacífico (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Zbikowska 2003), y la tilapia transgénica (www.pewagbiotch.org, *A look at the science: How transgenic fish are created & examples of current research*) con copias extra de su propia GH, están pendientes de la aprobación de una norma reguladora para su posible comercialización. Sin embargo, la mayoría de las aproximaciones descritas continúan relegadas exclusivamente al plano de la investigación, y en muy pocos casos se ha intentado su comercialización. Ésto se debe, en parte, a la existencia de ciertas limitaciones que resultan en una expresión insuficiente del gen introducido, o incluso en un silenciamiento del mismo (sirva de ejemplo los salmones con el gen de la proteína anticongelante comentado anteriormente); o bien, en la existencia de una baja tasa de transmisión a la descendencia, entre otras. Estas limitaciones podrán superarse con la obtención de un mayor conocimiento de la función génica en peces, y con el perfeccionamiento y mejora de las técnicas utilizadas para la obtención de peces transgénicos, y que a continuación se describen.

1.2.- PECES TRANSGÉNICOS: TECNOLOGÍA DE LA TRANSFERENCIA GÉNICA

La transferencia génica nos permite modificar las características hereditarias de un animal mediante técnicas de ingeniería genética. Para ello, existen dos estrategias, una sería la introducción de genes nuevos (transgénesis convencional) con el objeto de introducir nuevas características; la otra estrategia, consiste en la eliminación de un gen endógeno, o su reemplazamiento por una versión alterada de ese gen, lo que nos permite eliminar características indeseables. Esta segunda aproximación, conocida como *knock-out* se encuentra totalmente establecida en ratón, pero está poco desarrollada hasta el momento en peces. Esta tecnología depende de la obtención de una línea de células embrionarias totipotentes *in vitro*, las cuales sean capaces de formar parte de la línea germinal una vez implantadas en un embrión (ver apartado 4).

En cuanto a la metodología para el desarrollo de un pez transgénico convencional, existen varios pasos que se detallan a continuación:

1.- El primero sería respecto al **DNA foráneo** a introducir. Éste debe poseer la secuencia codificante completa del gen que deseamos expresar, junto con todas las secuencias reguladoras que aseguren una expresión eficiente. En la mayoría de estudios básicos que utilizan peces transgénicos se usan promotores de origen viral. Estos se encuentran bien caracterizados, y aseguran una expresión muy fuerte de los genes que se hallan bajo su control (ej. promotor CMV). Sin embargo, en el caso de que el pez transgénico vaya a tener una aplicación biotecnológica es deseable que todas estas secuencias provengan también de un pez y que se eliminen todas las secuencias bacterianas que han sido necesarias para su construcción. Todavía existen pocos promotores y secuencias reguladoras aisladas de peces; una de las más utilizadas en diversas especies de peces ha sido el promotor de la actina β de carpa (Liu *et al.* 1990; Maclean *et al.* 1992; Moav *et al.* 1993; Alam *et al.* 1996). Otros promotores de origen piscícola utilizados son los de las proteínas anticongelantes de la babosa vivípara

americana (Fletcher *et al.* 1988; Hew *et al.* 1992) y los de las metalotioninas de trucha (Inoue *et al.* 1992; Hong *et al.* 1993).

2.- El paso siguiente es la **introducción del DNA** en los embriones. Ésta debe hacerse cuando el embrión está en una de sus primeras divisiones (estado de 1 a 4 células), y el método más utilizado es la inyección del DNA en el citoplasma de una de estas células. La inyección de la solución de DNA directamente en el núcleo celular resultaría en una mayor eficacia del proceso, pero desafortunadamente durante estas primeras fases del desarrollo el núcleo de las células embrionarias no es visible.

Existen otros métodos en los que se utiliza el espermatozoide como portador del DNA en el momento de la fertilización. Para ello se realiza la electroporación del espermatozoide con el DNA exógeno. Esta técnica, aunque se ha demostrado que es viable (Muller *et al.* 1992), no ha resultado reproducible en muchos casos (Chourrout & Perrot 1992) o bien, la eficiencia a la hora de integrarse o expresarse el transgen ha resultado muy baja (Sin *et al.* 2003). También se ha evaluado el uso de retrovirus atenuados que puedan infectar las células del embrión (Lin *et al.* 1994). Sin embargo, este método tiene algunas limitaciones, como son un tamaño límite del DNA a introducir o la necesidad de altas medidas de seguridad en los primeros pasos de su realización. Por ello, su uso se ha visto limitado sólo a ciertos laboratorios. Más recientemente, se han empleado elementos transponibles de pez para la introducción del DNA en el genoma del huésped (Ivics *et al.* 1997), y se han obtenido muy buenos resultados en integración y expresión en pez cebra (Davidson *et al.* 2003). En cualquier caso su uso no está de momento lo suficientemente extendido como para comparar su eficacia con la de inyección en el citoplasma, que sigue siendo, por tanto, el método más ampliamente utilizado. Además de la electroporación de espermatozoide, se está evaluando el empleo de otros métodos masivos, como el bombardeo de micropartículas en huevos fecundados para la introducción del DNA (Kinoshita *et al.* 2003). Esta aproximación puede ser valiosa para su aplicación en especies de peces donde se pueda disponer de una gran cantidad de huevos. Estas técnicas evitarían la tediosidad de la introducción del DNA en cada huevo individualmente.

3.- **Integración del DNA en el genoma del huésped.** Una vez el DNA se ha introducido en una de las células del embrión en desarrollo, éste debe dirigirse al núcleo y posteriormente integrarse en el genoma del organismo huésped. La integración del DNA es un paso limitante en la producción de un pez transgénico. Esta integración ocurre al azar, o sea, el DNA se puede integrar en cualquier sitio del genoma. Además, la integración no se produce inmediatamente después de la inyección. En las primeras fases del desarrollo (blástula, gástrula) cuando las células están dividiéndose activamente, el DNA introducido, que todavía es extracromosomal, empieza a ser replicado por la maquinaria del huésped produciéndose una amplificación del mismo. La integración del DNA se produce en etapas tardías de la embriogénesis, y de manera independiente en las distintas células. Ésto da lugar a la aparición de mosaicismo en esta primera generación, y puede observarse que no todas las células del organismo contienen el transgen. Además, aquellas que lo han integrado, presentan distinto número de copias del mismo. Otra de las consecuencias de la integración tardía es la existencia de mosaicismo también en las células de la línea germinal, esto dará lugar a una baja frecuencia de transmisión del transgen a la descendencia, que es el paso final en la producción de un transgénico estable. Sin embargo, en la segunda generación transgénica ya se obtiene una transmisión mendeliana.

4.- Debido a la integración tardía que comentábamos anteriormente, el patrón de la **expresión del gen introducido** también presentará mosaicismo, esto es, no todas las células del organismo están expresando el transgen. También pueden aparecer problemas de falta de expresión debido a la inactivación del DNA introducido por parte de la célula huésped, a través de metilación o formación de heterocromatina. Para solucionar estos problemas se está ensayando actualmente el uso de secuencias que puedan “aislar” al gen introducido de la formación de cromatina inactiva a su alrededor (Caldovic & Hackett, Jr. 1995; Caldovic *et al.* 1999).

Otro de los puntos importantes en la obtención de un pez transgénico, es el desarrollo de sistemas que permitan un mejor control de la expresión génica. El control exógeno de la expresión de un transgen en peces es una necesidad tanto en los estudios de regulación génica como en los trabajos con fines biotecnológicos. Los genes exógenos deben permanecer silenciados cuando su expresión no es necesaria. La experiencia en peces, con los promotores inducibles disponibles hasta el momento (metalotionina, de choque térmico) ha sido frustrante por motivos de escape del promotor (*leakness*), poca fidelidad en la inducción o problemas con el inductor aplicado exógenamente. Para muchas de las aplicaciones, también sería deseable el control espacial de la expresión del transgen. Este control se puede conseguir mediante el uso de promotores específicos de tejido para dirigir la expresión del transgen.

5.- Transmisión a la descendencia. El último paso en la generación de un transgénico sería conseguir la presencia del gen exógeno en la línea germinal, para asegurar que el transgen pasará a la siguiente generación.

Debido a la integración tardía, la transmisión en peces es baja, con una media de un 15% de la descendencia que ha incorporado el transgen. Además, esta transmisión es más baja en animales con ciclos vitales más largos (2-5%) (Fletcher *et al.* 1988), sin embargo en algunos casos, como la trucha, se han encontrado transmisiones a un 20 o incluso 50% de la progenie (Chourrout *et al.* 1986). Por último, pueden aparecer también fenómenos de silenciamiento incluso después de varias generaciones.

1.3.- CONSIDERACIONES BIOÉTICAS Y AMBIENTALES DE LA TRANSGÉNESIS EN ACUICULTURA

Existe una gran preocupación pública por el posible impacto medioambiental y el peligro para la salud pública de los peces transgénicos.

Los peces, por vivir en un medio natural como el agua, tienen más posibilidades de escapar de su confinamiento que los animales terrestres. El escape de peces transgénicos podría ocasionar que estos se cruzaran con ejemplares salvajes, y transmitiesen el gen a la población salvaje. Se ha debatido mucho sobre si esto podría

plantear un problema medioambiental en detrimento de las líneas salvajes, pese a la evidencia de que estos peces transgénicos, poseen una menor viabilidad que los salvajes (Regal 1987). Estudios más recientes demuestran que el riesgo de un impacto ecológico no sólo reside en la viabilidad de estos animales, sino que también, la transferencia de un gen que confiera un mayor éxito de apareamiento en machos, puede influir decisivamente (Muir & Howard 1999). Se ha demostrado que peces medaka a los que se transfirió la GH de salmón, presentan una ventaja en el apareamiento respecto de los salvajes (Howard *et al.* 2004).

Una posible solución, que por supuesto también encarecería la producción, sería el uso de peces transgénicos estériles. Se pueden generar peces triploides, los cuales son estériles en todas las especies ensayadas (Benfey 1999; Felip *et al.* 2001). Por medio de la transgénesis, también se pueden conseguir peces estériles. Eligiendo como diana genes fundamentales en el desarrollo gonadal, como son los de las gonadotrofinas o las hormonas liberadoras de gonadotrofina, y utilizando la técnica del RNA antisentido, se pueden generar transgénicos incapaces de producir estas hormonas y por tanto, estériles. Además, esta esterilidad se puede revertir, mediante la inyección externa de estas hormonas en el momento deseado. Hasta la fecha, los resultados obtenidos en la generación de este tipo de peces transgénicos son esperanzadores (Uzbekova *et al.* 2000; Maclean *et al.* 2002).

Las proteínas nuevas expresadas en los peces transgénicos, podrían no ser seguras y provocar riesgos en la salud humana. No existen evidencias acerca de esto. Pese a todo, sería conveniente un control exhaustivo tanto de los componentes utilizados en las construcciones de DNA, como de cada línea de peces transgénicos producida. Por último, el consumo de peces transgénicos podría generar reacciones alérgicas o problemas de tolerancia en los consumidores. Sin embargo, un trabajo en el que se alimentó a primates con peces transgénicos, ha demostrado que la dieta a base de peces transgénicos no produjo efecto adverso alguno sobre ellos (Guillen *et al.* 1999).

2.- LOS SISTEMAS INDUCIBLES

Tanto en los estudios básicos sobre función génica, como en los trabajos con fines biotecnológicos, se requiere un estrecho control sobre la expresión de los genes exógenos. Los genes exógenos deben permanecer silenciados cuando su expresión no es necesaria. Además, uno de los pasos limitantes a la hora de generar animales transgénicos, es el control de la expresión del transgen. Una sobreexpresión del transgen durante las primeras etapas del desarrollo puede resultar letal para el embrión, por lo tanto interesa poder controlar su expresión durante todo el proceso. Como respuesta a esta necesidad, se han desarrollado diversos sistemas inducibles basados en el control transcripcional mediante elementos reguladores. Para una mejor comprensión del texto, estos sistemas inducibles se han clasificado, según la naturaleza de los elementos reguladores que los forman, en dos grupos: a) los sistemas de regulación de la expresión génica procedentes de eucariotas superiores y b) los sistemas procedentes de organismos inferiores.

A.- Los sistemas procedentes de eucariotas superiores están basados en mecanismos reguladores específicos de las células de distintas especies. Se usan construcciones en las que el gen de interés se encuentra bajo el control de un promotor que responde a una sustancia o estímulo exógeno determinado: citoquinas, interferones, metales pesados, choques térmicos, e hidrocarburos aromáticos.

En peces, los promotores inducibles más utilizados hasta el momento son:

- El **promotor de la metalotionina**, que se ha aislado en varias especies de peces, trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Zafarullah *et al.* 1988; Olsson *et al.* 1995; Samson & Gedamu 1995), salmón pacífico (*Oncorhynchus nerka*) (Chan & Devlin 1993), pez de hielo (*Chionodraco hamatus*) (Scudiero *et al.* 2001), pez cebra (Yan & Chan 2002; Yan & Chan 2004), y carpa (*Cyprinus carpio*) (Chan *et al.* 2004). Su aplicación para la regulación de genes exógenos no ha resultado satisfactoria. Por una parte, la inducción de este promotor se realiza con metales pesados, que por su

naturaleza tóxica pueden alterar la fisiología del animal tratado. Por otra parte, la expresión a partir de este tipo de promotores, es generalmente lo suficientemente alta como para permitir que éste funcione sin necesidad de inductor, lo que no lo hace eficiente como sistema de regulación (Chan & Devlin 1993).

- El **promotor del gen de la proteína de choque térmico Hsp70**, ha sido otro de los sistemas inducibles ensayados en peces. Se han ensayado promotores de origen homólogo (Molina *et al.* 2002) y heterólogo (Adam *et al.* 2000). Se ha utilizado el promotor del gen de choque térmico de pez cebra *hsp70* para dirigir la expresión del transactivador Gal4/VP16 en pez cebra (Scheer *et al.* 2002) y en medaka (Grabher & Wittbrodt 2004), y de la Cre recombinasa en embriones de pez cebra (Thummel *et al.* 2005). En todos los casos se ha conseguido un buen nivel de inducción, pero ésta era sólo transitoria, y desaparecía una vez reparado el efecto del choque térmico que servía como inductor, no siendo viable mantener a los animales bajo una inducción permanente.

- Esencialmente, todos los organismos poseen genes conservados que responden a la presencia de elementos xenobióticos. Los citocromos P450 son uno de los sistemas enzimáticos más importantes que participan en la detoxificación. En presencia de hidrocarburos aromáticos, el **promotor del citocromo CYP1A1**, clonado en varias especies marinas, se activa de manera natural para permitir la transcripción de las enzimas del sistema detoxificante. Al igual que se ha hecho con su homólogo en mamíferos (Jones *et al.* 1991; Campbell *et al.* 1996), este promotor se ha utilizado para controlar la transcripción de un gen exógeno en pez cebra (Mattingly *et al.* 2001). Sin embargo, estos sistemas no son aconsejables porque se ha demostrado que, los hidrocarburos que actuarían como inductor tienen un efecto hepatotóxico y producen disfunciones reproductivas e inmunológicas (Rice & Roszell 1998; Exon & South 2000; Rolland 2000).

Existe otro tipo de sistemas homólogos que han sido utilizados con éxito en mamíferos, y que potencialmente podrían ser utilizados en peces aunque todavía no se han evaluado:

- En mamíferos, se ha probado la eficiencia de un determinado **promotor inducible por un interferón** en la regulación de la expresión de diferentes receptores de la serotonina (Vanhoenacker *et al.* 1997). En peces, la reciente identificación de genes inducibles por interferones en salmón pacífico (*Oncorhynchus tshawytscha*) abre nuevas posibilidades por esta vía (Alonso & Leong 2002). De hecho, los promotores del gen Mx1 de trucha y del factor 1A, regulados por interferón (IRF1A), se han utilizado para regular la expresión de luciferasa en la línea celular de salmón CHSE-214 y en la línea EPC de carpa (Alonso *et al.* 2003). En condiciones transitorias se consiguió un nivel aceptable de inducción. Sin embargo, aún no se ha probado su eficiencia en una línea celular de peces de manera estable ni tampoco *in vivo*.

- El **sistema inducible por glucocorticoides** se basa en el uso del promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) (Kumar *et al.* 1987), que es regulado por la presencia de receptores de glucocorticoides en su forma activa. Las moléculas de receptor se encuentran formando un complejo citoplasmático con proteínas de choque térmico. En presencia de glucocorticoides, tales como la dexametasona, los receptores se unen a ella, y son capaces de liberarse y translocarse al núcleo dónde se unen a sitios del DNA específicos para unión del complejo receptor-glucocorticoide, activando promotores como el MMTV e iniciándose la transcripción. Para su uso como sistema inducible se necesitan dos construcciones. La primera, que contenga el gen de interés bajo el control de los elementos que responden a los receptores activados, y la segunda, que de forma constitutiva exprese el receptor de glucocorticoides (Israel & Kaufman 1989). Esta segunda construcción no es necesaria en aquellos tipos celulares donde la producción endógena del receptor de glucocorticoides es suficientemente alta. También se han descrito alternativas que presentan el sistema bajo un mecanismo de autorregulación (Ko *et al.* 1989).

El problema más generalizado de los sistemas inducibles basados en promotores de especies próximas es la aparición de efectos pleiotrópicos. Al tratarse de elementos que de forma natural se encuentran en las células huésped pueden interactuar con otros sistemas endógenos provocando efectos no deseados.

B.- Los sistemas procedentes de organismos inferiores se basan en elementos reguladores procedentes de organismos alejados evolutivamente respecto de los mamíferos, como *Escherichia coli*, *Drosophila melanogaster* y otros. Algunos de estos sistemas, ya se han utilizado con éxito en peces:

- La **T7 RNA polimerasa**, específica del bacteriofago T7, es capaz de actuar sobre un promotor específico. Este sistema se ha utilizado para el control de la expresión de genes exógenos sobre todo en bacterias (Alexander *et al.* 1992; Conrad *et al.* 1996; Szafranski *et al.* 1997). También se ha descrito su uso en células de mamíferos, y se ha comparado con otros sistemas inducibles (Meyer-Ficca *et al.* 2004). En peces, los primeros estudios sobre la eficiencia del sistema basado en la T7 RNA polimerasa *in vivo* se realizaron en huevos de pez cebra (*Danio rerio*). Se cotransfectó, un plásmido que expresaba la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor CMV, junto con otra construcción que contenía el promotor T7 seguido del gen de la β -galactosidasa (*lacZ*) de *Escherichia coli*. Al cabo de 24 horas, se detectó la expresión del gen indicador en los embriones transgénicos, mientras que en aquellos embriones que sólo se había inyectado el plásmido con el gen indicador, no se detectó apenas expresión (Verri *et al.* 1997). Este sistema evaluado de forma transitoria en células de mamífero, presenta un nivel de expresión basal muy reducido y un buen nivel de inducción, comparado con otros sistemas inducibles, aunque el nivel máximo de expresión sea menor (Meyer-Ficca *et al.* 2004). Al no tratarse de un sistema propiamente inducible, uno de los problemas inherentes a esta estrategia es la imposibilidad de un control externo de la expresión, como es la adición / sustracción de una sustancia. Además, su uso puede provocar rechazo debido a su naturaleza vírica.

- El **sistema Gal4/UAS** consiste en un transactivador híbrido formado por el activador de la transcripción Gal4 de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) unido al activador de origen vírico VP16. Para activar la transcripción, este transactivador debe unirse a su secuencia de reconocimiento UAS (*Upstream Activating Sequence*), que estará regulando la expresión del gen de interés (Sadowski *et al.* 1988). Este sistema se ha utilizado en el pez cebra (Argenton *et al.* 1996; Scheer *et al.* 2002; Hans *et al.* 2004), aunque tampoco es un sistema propiamente inducible. Por lo tanto, para poder controlar la expresión de un gen de forma exógena, necesita combinarse con un promotor inducible que dirija la expresión del transactivador, tal y como se ha descrito en medaka donde se ha utilizado el promotor del gen *hsp70* de pez cebra (Grabher & Wittbrodt 2004).

Existe una versión del sistema más reciente que añade la facultad de que la transcripción pueda inducirse mediante la adición de un antagonista de la progesterona, la mifepristona. Este sistema consta de un transactivador quimérico formado por el activador de la levadura Gal4, unido a un activador transcripcional, y a una parte del receptor de progesterona humano capaz de unirse a la mifepristona, lo que provoca en él un cambio conformacional. En presencia de mifepristona, el transactivador quimérico puede unirse al promotor reconocible por Gal4 seguido de una secuencia TATA e iniciar la transcripción (Wang *et al.* 1994; Oram *et al.* 2001). Estos sistemas podrían considerarse de tipo mixto, ya que incorporan elementos propios de levadura, pero como inductores se utilizan hormonas de mamífero o sus análogos sintéticos. En pez cebra, se ha utilizado una estrategia similar; mediante un transactivador híbrido que es la fusión de parte de un receptor de glucocorticoides y Gal4. Usando dexametasona como inductor, se ha conseguido el control de la expresión de genes exógenos (de Graaf *et al.* 1998). Para su uso sistemático, habría que evaluar previamente los posibles efectos secundarios de la dexametasona en peces. Existen estudios dónde se demuestra que, su administración en las primeras fases del desarrollo puede conllevar alteraciones del crecimiento, del sistema inmune, endocrino y neurológico en primates (Coe & Lubach 2005), y además, predispone a padecer enfermedades autoinmunes en ratas (Bakker *et al.* 2000). Estudios en cultivos primarios de células de salmón, demuestran

que la dexametasona es capaz de inhibir la respuesta al tratamiento con hormona del crecimiento (GH) (Pierce *et al.* 2005). Así mismo, se han realizado estudios *in vitro* donde la dexametasona es capaz de unirse y activar los receptores de glucocorticoides de trucha (Bury *et al.* 2003) (Lee *et al.* 1992). El tratamiento con dexametasona a dosis menores que las utilizadas por de Graaf, inducía la secreción de GH en células hipofisarias de trucha (Luo & McKeown 1991).

- El **sistema Cre/lox**, procedente del bacteriofago P1, se basa en el uso de una recombinasa (Cre) que es capaz de localizar secuencias específicas de DNA (lox), y llevar a cabo una recombinación eliminando el DNA situado entre secuencias lox. Se puede, así, interponer una secuencia de DNA, que codifique para otro gen o para una señal de parada de la transcripción, flanqueada por sitios lox, entre el gen de interés y su promotor. De esta manera, el gen de interés permanece silenciado hasta que la recombinasa actúa eliminando la secuencia de parada o el gen que lo precedía, y permite su transcripción. En pez cebra se ha utilizado esta estrategia; en un caso se inyectaba RNA de *Cre* en el embrión posibilitando así la inducción del gen de interés (Langenau *et al.* 2005), en otro caso, *Cre* se encontraba bajo el control del promotor del gen *hsp70* de pez cebra, con lo que la expresión de la recombinasa podía controlarse de manera temporal (Thummel *et al.* 2005). Una de las mayores desventajas de este sistema es, que una vez se ha producido la recombinación y excisión del DNA flanqueado por los sitios lox, la situación no es reversible.

La mayoría de los sistemas heterólogos procedentes de organismos inferiores, que se han utilizado con éxito en mamíferos, no se han evaluado todavía en peces. A continuación se describen algunos de estos sistemas:

- El **sistema inducible por ecdisona**, utiliza una hormona propia de insectos y su receptor. Este sistema se ha adaptado para su uso en células de mamífero (No *et al.* 1996). Para ello, se construyó un nuevo transactivador mediante la fusión de una parte del receptor de la ecdisona al activador viral de la transcripción VP16. De esta manera,

este receptor modificado adquiriría la capacidad de activar la transcripción en mamíferos, mientras mantenía los elementos de respuesta a la ecdisona y su afinidad por ésta. Finalmente, el elemento de respuesta a la ecdisona también se modificó, para evitar reacciones cruzadas con receptores nucleares propios de las células de mamífero. El receptor retinoide X de mamíferos es capaz de unirse al receptor modificado en la presencia de ecdisona o sus análogos. Este trímero activa la transcripción al unirse a las secuencias específicas de unión a la ecdisona contenidas en el promotor que controla la expresión del gen de interés. Este sistema ha resultado eficiente en líneas celulares de mamífero, dando lugar a niveles moderados de expresión y manteniendo una expresión basal muy reducida. Sin embargo, en algunas líneas celulares no se ha podido establecer (Van Craenenbroeck *et al.* 2001), y su eficacia *in vivo* no está suficientemente probada.

- El **operón Lac** de *Escherichia coli*, también se ha adaptado para su funcionamiento como sistema de control de la expresión de genes exógenos en células de mamífero. Sin embargo, con este sistema conseguir un estado de represión completa resulta difícil (Paulus *et al.* 1997).

- El **sistema de regulación por tetraciclina** se ha convertido en el más utilizado en mamíferos, y se explica detalladamente a continuación.

EL SISTEMA DE REGULACIÓN POR TETRACICLINA

Actualmente, el sistema para la regulación de la expresión de genes exógenos más utilizado en mamíferos es el sistema de regulación por tetraciclina (Gossen & Bujard 1992). Este sistema inducible se ha utilizado con éxito en ratones transgénicos (Furth *et al.* 1994; Kistner *et al.* 1996), en *Drosophila* (Stebbins *et al.* 2001; Stebbins & Yin 2001) y en diferentes líneas celulares (Howe *et al.* 1995; Izumi & Gilbert 1999; Strathdee *et al.* 1999; Gopalkrishnan *et al.* 1999). La aplicación de este sistema ha permitido avances importantes en el campo de la biomedicina, ayudando a comprender algunos mecanismos moleculares del cáncer (Maddison & Clarke 2005) y otras

enfermedades, y aportando un mejor control en los tratamientos con terapia génica (Dor *et al.* 2002; Castillo-Ureta *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2004; Dumortier *et al.* 2005). Sin embargo, su posible aplicabilidad en peces todavía no se ha evaluado.

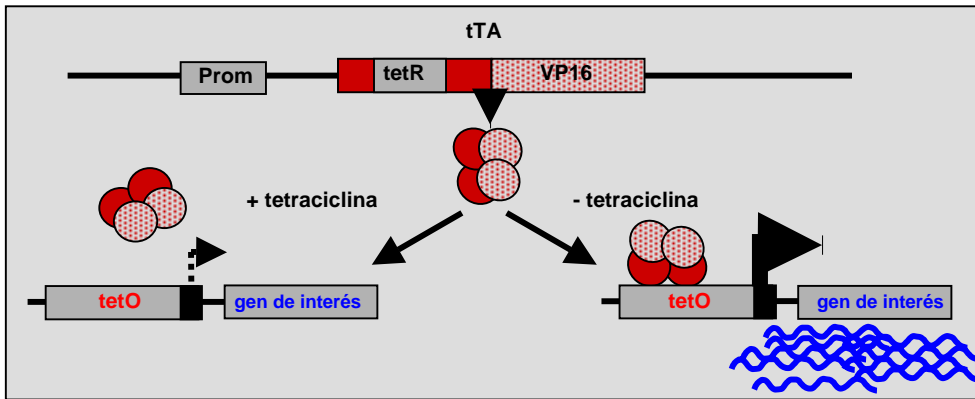
Este sistema se basa en los elementos que regulan la expresión del operón de resistencia específica a la tetraciclina Tn10 de *E. coli*. En *E. coli*, la proteína represora TetR bloquea la transcripción de los genes de resistencia a la tetraciclina contenidos en el operón. Así, en ausencia de tetraciclina TetR está unido a secuencias específicas del operador (*tetO*) dentro de la región promotora del operón, impidiendo la transcripción. En presencia de tetraciclina, TetR interacciona y se une a ella. De esta manera, TetR se libera de su unión al operador y permite la transcripción.

El sistema de regulación por tetraciclina, adaptado para células de mamífero por Gossen y Bujard (Gossen & Bujard 1992), consta de dos componentes. El primero es un transactivador híbrido, tTA, que se construyó mediante la fusión del dominio de unión al DNA del represor TetR con el dominio C-terminal del activador transcripcional VP16 del virus del herpes simple (HSV) (Triezenberg *et al.* 1988). El segundo componente consta de un promotor mínimo fusionado a las secuencias del operador *tetO*; éstas son las secuencias que regularán la expresión del gen que queremos controlar. En ausencia de tetraciclina, el transactivador tTA se une a las secuencias del operador, y se activa la transcripción del gen situado a continuación gracias a la presencia del activador VP16. Sin embargo, en presencia de pequeñas cantidades de tetraciclina, ésta se une a tTA, y evita que tTA se una al operador, permaneciendo así el promotor mínimo silenciado. Esta versión del sistema se conoce con el nombre de *tet-off* (fig 1.3A).

Posteriormente se desarrolló otra versión llamada *tet-on* (fig 1.3B). Ésta se basa en un transactivador denominado rtTA. rtTA consta de los mismos componentes que tTA, pero su parte TetR se ha obtenido mediante mutagénesis al azar de la versión original, de manera que se obtuvo una proteína nueva capaz de unirse a las secuencias del operador *tetO* solamente en presencia de tetraciclina (Gossen *et al.* 1995). Este sistema es especialmente útil cuando la expresión del gen de interés sólo se requiere en periodos cortos de tiempo, pues así, se minimiza el uso de antibióticos.

Regulación de la expresión génica por tetraciclina

A



B

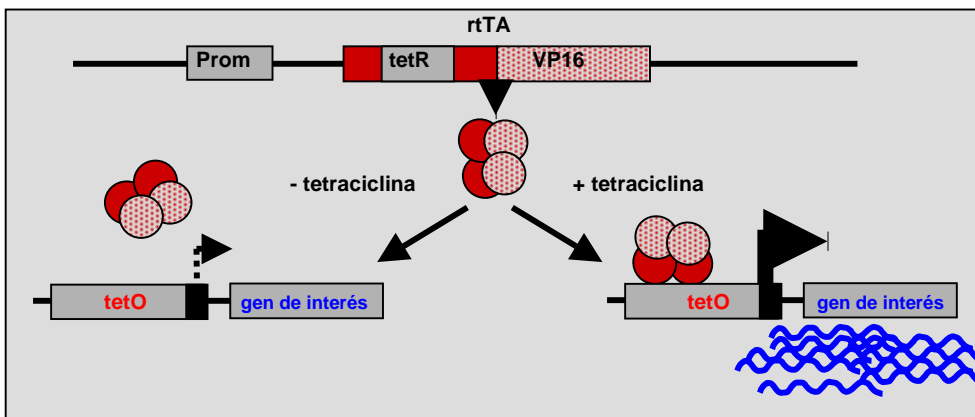


Fig.1.3.- Funcionamiento de los sistemas de regulación por tetraciclina *tet-off* (A) y *tet-on* (B).

El establecimiento del sistema de regulación por tetraciclina en líneas celulares en su forma original requiere de dos transfecciones sucesivas. Primero, se realiza una transfección estable con el plásmido que contiene el transactivador, y el gen que confiere resistencia a un determinado antibiótico. Tras seleccionar con el antibiótico aquellos clones que contienen el transactivador, se buscan aquellos en los que la expresión de éste es la más adecuada. Para ello, se realizan sobre los clones transfecciones transitorias con el plásmido que contiene el gen de interés bajo el control del promotor que responde a tetraciclina. Se seleccionan aquellos clones que presentan un menor nivel de expresión basal en condiciones de represión, y un mayor grado de inducción. Sobre estos clones, se debe realizar una segunda transfección estable con el plásmido que contiene el gen de interés bajo el control del promotor que responde a tetraciclina, y con un gen de resistencia a un segundo antibiótico para su selección. Tras aislar los clones que sobreviven a la selección, se comprueba de nuevo cuales son aquellos con menor nivel de expresión basal y un mayor grado de inducción del gen introducido, o bien que posean las características requeridas para una determinada aplicación.

Desde su diseño inicial, el sistema de regulación por tetraciclina ha sufrido diversas modificaciones para intentar solucionar problemas inherentes a su uso o para ampliar sus posibles aplicaciones. A medida que el uso de este sistema se ha ido extendiendo, se ha visto la dificultad que algunas líneas celulares presentan para conservar el sistema de una manera funcional (Howe *et al.* 1995), así como la dificultad de obtener clones positivos con un grado óptimo de inducción. Esto se debe en muchos casos a que el transactivador (tTA o rtTA) resulta tóxico para las células, sobre todo si se encuentra en grandes cantidades. Por ello, se han desarrollado estrategias que permiten un mejor funcionamiento del sistema en mamíferos, facilitando la obtención de un mayor número de clones positivos. Entre otras, cabe destacar:

- **Modificaciones del promotor que responde a tetraciclina** con elementos reguladores propios de la línea celular u organismo que va a ser modificado (Hoffmann *et al.* 1997; Rose & MacDonald 1997).

- El uso de un **promotor bidireccional que responde a tetraciclina**, P_{bi-1} , que permite el control de dos genes de forma simultánea (Baron *et al.* 1995). Este promotor bidireccional contiene varias repeticiones de la secuencia *tetO* flanqueadas por un promotor mínimo en cada extremo, de manera que bajo el control de cada promotor se puede insertar un transgen. Cuando el transactivador se une a *tetO*, se inicia la transcripción en ambos sentidos, obteniéndose los productos de ambos transgenes simultáneamente.

- **El sistema autorregulado**, donde la expresión del transactivador se encuentra también regulada por tetraciclina. Se utilizan construcciones donde el transactivador y el gen de interés se encuentran bajo el control de un promotor sensible a la tetraciclina. En estado de no inducción, la expresión de ambos genes es tan sólo la basal del promotor. Al inducirlo, las pocas moléculas de transactivador presentes como resultado de la expresión basal del promotor, iniciarán la transcripción del transactivador y del gen de interés. De esta manera, se establece un bucle de retroalimentación positiva, y la transcripción de ambos genes es cada vez mayor hasta que se interrumpe la inducción. Con esta modificación se puede conseguir un mayor número de clones positivos conteniendo el sistema, ya que se minimiza la cantidad de transactivador en estado de no inducción, y con ello su posible efecto tóxico sobre las células (Shockett *et al.* 1995; Mohammadi & Hawkins 1998; Gould *et al.* 2000).

- Otras alternativas para tener un menor número de moléculas de transactivador por célula han sido el uso de **promotores diferentes a CMV** para dirigir su expresión. Se han utilizado promotores constitutivos de mamífero que no fueran tan fuertes como el CMV y que pertenecieran a genes esenciales (ej. EF-1 alfa), para impedir la inactivación de su expresión (Gopalkrishnan *et al.* 1999; Anastassiadis *et al.* 2002). Para conseguir un control no sólo temporal, si no también espacial, de la expresión del transgen, se ha utilizado un promotor específico de tejido muscular para dirigir la expresión del transactivador rtTA en ratón (Grill *et al.* 2003).

- **Los represores tet**, tTSkid, tTS y tTRs, son construcciones en las que al dominio TetR original se le ha fusionado un represor transcripcional de mamífero (Freundlieb *et al.* 1999; Zhu *et al.* 2001; Knott *et al.* 2002; Rubinchik *et al.* 2005). Un problema inherente a rtTA es que retiene cierta afinidad por las secuencias de *tetO*, aún en ausencia de tetraciclina; esto origina que el nivel basal de actividad transcripcional sea demasiado alto. En ausencia de tetraciclina, estos represores reprimen la actividad transcripcional de *tetO*, disminuyendo el nivel basal en el estado de no inducción. Usados en combinación con rtTA, posibilitan una completa represión de la expresión del transgen, sin comprometer la inducción (Zhu *et al.* 2002).

Otra modificación es la fusión del represor TetR con un dominio de la proteína humana Mad 1, capaz de interactuar con las enzimas responsables de la deacetilación de las histonas. El grado de acetilación de las histonas está directamente relacionado con el nivel de expresión de los genes. De esta manera, el represor modificado es capaz de reclutar deacetilasas al unirse a *tetO*, y se consigue un mayor silenciamiento de la expresión del transgen cuando no está inducido (Jiang *et al.* 2001).

También, existen estudios que demuestran que el represor original TetR, sin fusionar a ninguna otra molécula, puede actuar como modulador para la regulación de genes exógenos en células de mamífero (Yao *et al.* 1998):

- Se ha generado una **nueva variante de rtTA**, rtTA2^S-M2; mediante la modificación de ciertas secuencias del rtTA original, estos cambios incluyen un uso de codones más apropiado para las células de mamífero. Muestra una menor actividad basal, una mayor sensibilidad al antibiótico inductor, y una mayor actividad transcripcional que el rtTA original (Urlinger *et al.* 2000a).

- Con objeto de disminuir la toxicidad de los transactivadores originales, tTA y rtTA, se han realizado **modificaciones del activador transcripcional VP16** (Baron *et al.* 1997; Kamper *et al.* 2002), o se han usado otros dominios de activación transcripcional (Urlinger *et al.* 2000b; Akagi *et al.* 2001).

- Para facilitar el establecimiento del sistema también se han utilizado **vectores virales**, como el virus del herpes simple, retrovirus y adenovirus para su introducción en células de mamífero (Paulus *et al.* 1996; Hofmann *et al.* 1996; Agha-Mohammadi &

Lotze 2000; Kenny *et al.* 2002), o de vectores extracromosomales basados en el virus de Epstein-Barr (Sclimenti *et al.* 2000).

Así mismo, se han desarrollado **técnicas que facilitan la detección de clones positivos** que presenten un grado óptimo de inducción, como:

- El uso de una proteína de fusión entre el transactivador *tet* y la GFP (Callus & Mathey-Prevot 1999). Esta estrategia permite inferir, mediante la observación de la GFP, cual es el nivel de expresión del transactivador, y que su expresión no se encuentre silenciada.
- Con la misma finalidad, se han usado construcciones bicistrónicas formadas por el gen del transactivador unido mediante una secuencia IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*) a un gen indicador como la GFP (Mosser *et al.* 1997; Wells *et al.* 1999) o la SEAP (*Secretable Embryonic Alkaline Phosphatase*) (Kirchhoff *et al.* 1995).
- Otra estrategia ensayada ha sido el uso de un vector conteniendo un gen de resistencia a antibiótico dirigido por *tetO*. Así, el tratamiento con el antibiótico permite seleccionar aquellas células que expresan el transactivador de manera funcional, y por lo tanto la resistencia al antibiótico (Chambard & Pognonec 1998).

De una forma análoga al funcionamiento del sistema de regulación por tetraciclina, se ha descrito recientemente, **el sistema reprimible (PipOFF) y el sistema inducible (PipON) por pristinamicina**. Ambos se basan en el represor Pip (*Pristinamycin-Induced transcriptional regulator Protein*). Esta proteína está codificada por el operón de resistencia a los antibióticos del grupo de las estreptograminas de *Streptomyces coelicolor* (Fussenegger *et al.* 2000; Fux *et al.* 2001).

3.- TRANSFERENCIA GÉNICA SOMÁTICA

A diferencia de la transgénesis estable, donde se pretende conseguir la transmisión del gen introducido a la línea germinal, un nuevo concepto de transgénesis ha aparecido con las técnicas de introducción, bien por inyección o por métodos balísticos, de DNA foráneo en tejido somático de un animal adulto. El uso de esta técnica puede convertirse, en algunos casos, en una alternativa a la transgénesis estable, por ejemplo cuando sólo se necesita la presencia de un producto en un periodo determinado de la vida del pez. Su rapidez y sencillez técnica la hacen también aconsejable para el estudio de promotores y construcciones. En acuicultura, está resultando un método válido para la vacunación de peces. Además, el hecho de que el DNA exógeno no se integre en el genoma del huésped aumenta la seguridad de esta técnica. Al ser una técnica no invasiva para el material genético de los peces, puede provocar menos susceptibilidad pública que la transgénesis por integración estable.

La inyección de DNA plasmídico en tejido somático de animales adultos se realizó por primera vez en músculo de ratón (Wolff *et al.* 1990), y se comprobó que las células musculares seguían expresando los genes incluso mucho tiempo después de la inyección (Wolff *et al.* 1992). El desarrollo de esta técnica en mamíferos ha ido fundamentalmente encaminado a estudios de terapia génica. Además, el hecho de que las proteínas sintetizadas puedan pasar al torrente sanguíneo la hace potencialmente más interesante. Así, se ha descrito como, a través de la inyección directa del gen de la eritropoyetina en músculo de ratón, esta proteína era sintetizada por las células musculares y podía detectarse en sangre durante 90 días (Tripathy *et al.* 1996). También se ha demostrado que la inyección en músculo de genes reguladores del sistema inmunológico, como son los de las citoquinas, provoca en el sistema inmune *in vivo* los efectos propios de estas proteínas (Raz *et al.* 1993).

En peces, distintos autores han demostrado que el músculo es un tejido diana adecuado para la inyección de DNA plasmídico. El primer experimento realizado con éxito, consistió en inyectar el gen de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT), contenido en un plásmido, en músculo de carpa (*Cyprinus carpio*) (Hansen *et al.*

1991). Posteriormente esta técnica se ha ensayado en otras especies de peces como tilapia, trucha, pez cebra, y dorada (*Sparus aurata*), mediante la inyección y expresión de distintos genes indicadores (Rahman & Maclean 1992; Anderson *et al.* 1996; Tan & Chan 1997; Dijkstra *et al.* 2001; Verri *et al.* 2003). En este tejido, el DNA plasmídico se puede mantener durante mucho tiempo sin degradarse o incorporarse en el DNA genómico, y además se consigue la expresión de los genes foráneos contenidos en el plásmido (Dijkstra *et al.* 2001).

En peces, la aplicación de esta técnica ha ido casi exclusivamente dirigida a la vacunación, utilizando vacunas recombinantes de DNA (Kanellos *et al.* 1999; Verri *et al.* 2003). La estrategia consiste en introducir en el músculo del pez un gen que codifica un antígeno apropiado, éste provoca una respuesta inmune en el tejido del animal, a modo de imitación de las vacunas tradicionales (Tang *et al.* 1992). Este tipo de estrategia, ha resultado útil para la vacunación de especies comerciales, como la trucha (Boudinot *et al.* 1998; Corbeil *et al.* 2000a; Corbeil *et al.* 2000b; Lorenzen *et al.* 2001) y el salmón, (Mikalsen *et al.* 2004) contra ciertos virus patógenos como el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) (Lorenzen *et al.* 2002; Kurath 2005; Biering *et al.* 2005). También en trucha, se ha conseguido protección inmunológica frente a una enfermedad viral mediante la inyección en músculo de una construcción que codifica un anticuerpo formado por una sola cadena de DNA frente al VHSV (Lorenzen *et al.* 2000).

En estudios básicos se ha demostrado el potencial de esta técnica para evaluar y analizar promotores, y construcciones de DNA en células de pez *in vivo* (Rahman & Maclean 1992; Schulte *et al.* 1998; Gomez-Chiarri & Chiaverini 1999).

4.- LÍNEAS CELULARES DE PECES: IMPORTANCIA EN ESTUDIOS BÁSICOS Y EN TRANSGÉNESIS

Las líneas celulares procedentes de peces se han utilizado mayoritariamente en estudios inmunológicos y patológicos, y muchas de ellas se desarrollaron con este propósito (Wergeland & Jakobsen 2001; Chen *et al.* 2004; Hu *et al.* 2004). Las líneas celulares facilitan el estudio epidemiológico de la enfermedad, permitiendo determinar la temperatura, las características del hospedador y la virulencia del patógeno, y ayudando así a entender mejor las interacciones entre hospedador y patógeno. Además, pueden servir para probar la eficiencia de las vacunas de DNA *in vitro* (Lai *et al.* 2003). También se han utilizado como sistemas de evaluación de las respuestas al estrés producido por distintos contaminantes medioambientales (Li & Zhang 2001; Molina *et al.* 2002; Okamura *et al.* 2002; Kamer *et al.* 2003; Mayer *et al.* 2003).

El conocimiento de la secuencia de los genomas de un número creciente de animales, incluidas varias especies de peces, ha demostrado que existe una gran similitud entre ellos, que no se corresponde con las diferencias existentes a nivel morfológico y fisiológico. Esto significa que la secuencia de un gen, únicamente, no sirve para predecir su función. Es necesario, pues, disponer de sistemas homólogos para poder expresar los genes que se estudian (Wise *et al.* 2002), ya que la funcionalidad de un gen puede verse afectada por el contexto donde se examina. De hecho, líneas celulares transfectadas con un mismo gen pueden mostrar respuestas diferentes (Howe *et al.* 1995). Por ello, el aumento del número de genes aislados de distintos peces, ha estimulado la necesidad de disponer de líneas celulares homólogas para abordar estudios fisiológicos a nivel molecular, y de la función y regulación génica en peces. Una línea celular de dorada, se ha utilizado para la producción y el estudio de la secreción de interleuquina 1 β (Pelegrin *et al.* 2004). También procedente de dorada, se han desarrollado líneas celulares como sistemas homólogos para el estudio del proceso de formación y mineralización del esqueleto en peces (Pombinho *et al.* 2004), y para estudios patológicos (Bejar *et al.* 1997). Para poder abordar estudios de función génica, las líneas celulares utilizadas deben ser susceptibles a la

transfección, para conseguir introducir y expresar los genes a analizar. Una de las líneas celulares más utilizadas con este propósito en peces es la línea celular de carpa EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini cells*) (Fijan *et al.* 1983), la cual se puede transfectar con una eficiencia aceptable (Bearzotti *et al.* 1992; Lopez *et al.* 2001).

Desde el punto de vista de la transgénesis, disponer de ciertos tipos celulares que permitan la transferencia de genes es muy ventajoso. En ratón, existen líneas establecidas de células madres embrionarias (ES) que retienen el potencial de desarrollarse en gametos. Estas células se pueden modificar genéticamente, bien para añadir o para eliminar un gen (*knock-out*), y posteriormente, pueden seleccionarse *in vitro* y transplantarse a un embrión donde contribuyen en el desarrollo del animal y también en la formación de la línea germinal.

Al igual que en ratón, una línea apropiada de células ES en peces debe ser capaz de retener la competencia para participar en el desarrollo del pez, una vez reimplantadas de nuevo en los embriones. Actualmente, en peces, se han realizado progresos en especies modelo como medaka y pez cebra. Así, en pez cebra se han conseguido embriones quimera para la línea germinal con la participación de una línea de células ES cultivadas *in vitro* (Fan *et al.* 2004). También se dispone de líneas de células ES procedentes de medaka (Hong *et al.* 1996; Hong *et al.* 1998) y de dorada (Bejar *et al.* 2002). Tras transplantar estas células en las primeras etapas de embriones en desarrollo, se ha visto que son capaces de participar en la formación de distintos tipos celulares en el animal adulto, sin embargo todavía no se ha demostrado su aportación a la línea germinal.

En el resto de especies de peces, donde no se ha conseguido cultivar células madre, disponer de líneas celulares propias de la especie resulta igualmente interesante. Además de poder disponer de un sistema homólogo para estudios de función génica, también podría ser factible la producción de animales transgénicos a partir de estas células. Para ello deben transfectarse inicialmente con el gen que confiere el carácter de interés, a continuación seleccionarse *in vitro* los clones deseados, y posteriormente transferir el núcleo de estas células a un oocito sin fecundar. Esta aproximación, se ha realizado en pez cebra, y se han conseguido animales transgénicos mediante

transferencia nuclear. El núcleo donador provenía de células de una línea de fibroblastos, modificadas genéticamente con el gen de la GFP (Lee *et al.* 2002).

5.- CONTROL DEL CICLO REPRODUCTIVO EN PECES

La domesticación de nuevas especies de peces plantea ciertos problemas como son, el control de su ciclo vital y la reproducción de las mismas en cautividad. Las hembras suelen tener dificultades en la maduración final de los oocitos, no llegando a las fases de ovulación y puesta (Zohar 1989a). Por otra parte, es deseable poder controlar el ciclo reproductor para disponer de ejemplares de talla comercial durante todo el año. Por su parte, los machos crecidos en cautividad pueden presentar cantidades escasas de esperma y además de baja calidad (Billard 1986; Billard 1989). Por otra parte, en algunas especies como es el caso de la lubina, los ejemplares machos son menos apreciados, desde el punto de vista económico, porque crecen más despacio que las hembras, también alcanzan antes la madurez sexual, produciéndose un crecimiento gonadal en detrimento del crecimiento somático, y además esto suele suceder antes de alcanzar la talla comercial. Los machos espermiantes no gustan al consumidor, lo que disminuye la venta y el rendimiento del cultivo. Por ello, en este caso sería deseable una maduración sexual más tardía.

Se ha tratado de buscar soluciones a este tipo de problemas mediante la manipulación de las condiciones ambientales: temperatura, fotoperiodo, salinidad, volumen del tanque y profundidad (Zohar 1989b; Munro *et al.* 1990). Otra aproximación que ha resultado de utilidad en diversas especies es el uso de hormonas inyectadas para inducir la puesta. Los primeros resultados se obtuvieron con la inyección de extractos crudos de pituitaria conteniendo gonadotrofinas (GTHs) (Houssay 1930). Hoy en día, se dispone de varios análogos sintéticos del factor liberador de las gonadotrofinas (GnRH), y de sistemas adecuados de liberación que permiten controlar la administración de los mismos (Zohar & Mylonas 2001).

La especie escogida en este trabajo es un teleósteo de la familia Moronidae, la lubina (*Dicentrarchus labrax*), por su gran interés comercial y por ser el principal organismo objeto de estudio en el departamento de Fisiología de Peces y Biotecnología del Instituto de Acuicultura de Torre la Sal. La lubina, es una especie perciforme, típicamente mediterránea. Es una especie gonocorista, en la que los machos maduran

sexualmente más temprano (2º año) que las hembras (3º año). En las poblaciones mediterráneas, sólo hay un periodo de puesta al año, que tiene lugar entre diciembre y marzo. Las hembras presentan un desarrollo ovárico de tipo sincrónico por grupos, produciendo tres o cuatro puestas consecutivas durante este periodo (Asturiano *et al.* 2000; Asturiano *et al.* 2002).

1.5.1.- POSIBLES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS SOBRE EL CICLO REPRODUCTIVO

Como se ha comentado anteriormente, los primeros intentos de controlar el ciclo reproductivo en peces se han basado en la manipulación de las condiciones ambientales o la inyección de extractos hormonales. A pesar de los resultados favorables obtenidos con estos métodos, es deseable disponer de hormonas propias de cada pez, en lugar de utilizar hormonas heterólogas. Por otra parte, el número de genes aislados y caracterizados que codifican hormonas de peces es cada vez mayor, lo que posibilita la utilización de técnicas de transgénesis. Esta aproximación también es importante para aumentar el conocimiento sobre los genes implicados en los mecanismos reproductivos y la relación entre ellos, pues el poder controlar con éxito el ciclo reproductivo depende también de estos conocimientos básicos.

1.5.2.- LAS HORMONAS GONADOTRÓFICAS (GTHs) Y SU PAPEL EN EL CICLO REPRODUCTIVO EN PECES

Las GTHs juegan un papel crítico como reguladoras de la gametogénesis y esteroidogénesis en la mayoría de los vertebrados, incluidos los teleósteos. Son heterodímeros constituidos por una subunidad común α y una subunidad β específica de cada hormona. Cada una de las subunidades está codificada por un gen único (Pierce & Parsons 1981). Ambas subunidades se asocian de forma no covalente en el retículo endoplásmico para constituir la hormona dimérica en su forma activa (Combarous 1992).

En muchas especies de teleósteos, se ha demostrado la existencia de dos tipos de GTHs: la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que

han tomado su nombre de las GTHs de mamíferos. De una forma similar a lo que ocurre en mamíferos, los estudios fisiológicos realizados en salmónidos, indican que la FSH está involucrada en las fases iniciales de la gametogénesis, y la LH regula principalmente el final de la maduración gonadal y la puesta (Schulz *et al.* 2001).

Los cDNAs que codifican las subunidades de la FSH, la LH y sus respectivos receptores se han clonado en varias especies de peces, incluyendo la lubina (Mateos *et al.* 2003; Rocha *et al.* 2003; Rocha *et al.* 2004). En esta especie, también se han realizado estudios de la expresión de las subunidades de las GTHs durante el ciclo reproductivo (Mateos *et al.* 2002). El conocimiento de la secuencia codificante de estas hormonas hace posible la realización de experimentos de transferencia génica, encaminados tanto a conocer la función de estas hormonas en la reproducción de la lubina, como a desarrollar aplicaciones biotecnológicas relacionadas con el control del ciclo reproductivo. Así, la puesta a punto de nuevas técnicas, puede constituir una herramienta adecuada para profundizar en distintos aspectos de la fisiología de esta especie, sentando bases de conocimiento para solucionar problemas específicos que se plantean en el cultivo de la lubina, como son el control de la pubertad o de la puesta.

Bibliografía

- Adam A, Bartfai R, Lele Z, Krone PH & Orban L 2000 Heat-inducible expression of a reporter gene detected by transient assay in zebrafish. *Exp.Cell Res.* **256** 282-290.
- Agha-Mohammadi S & Lotze MT 2000 Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *J.Clin.Invest* **105** 1177-1183.
- Akagi K, Kanai M, Saya H, Kozu T & Berns A 2001 A novel tetracycline-dependent transactivator with E2F4 transcriptional activation domain. *Nucleic Acids Res.* **29** E23.
- Alam MS, Lavender FL, Iyengar A, Rahman MA, Ayad HH, Lathe R, Morley SD & Maclean N 1996 Comparison of the activity of carp and rat beta-actin gene regulatory sequences in tilapia and rainbow trout embryos. *Mol.Reprod.Dev.* **45** 117-122.
- Alexander WA, Moss B & Fuerst TR 1992 Regulated expression of foreign genes in vaccinia virus under the control of bacteriophage T7 RNA polymerase and the Escherichia coli lac repressor. *J.Virol.* **66** 2934-2942.
- Alonso M, Johnson M, Simon B & Leong JA 2003 A fish specific expression vector containing the interferon regulatory factor 1A (IRF1A) promoter for genetic immunization of fish. *Vaccine* **21** 1591-1600.
- Alonso M & Leong JA 2002 Suppressive subtraction libraries to identify interferon-inducible genes in fish. *Mar.Biotechnol.(NY)* **4** 74-80.
- Amanuma K, Takeda H, Amanuma H & Aoki Y 2000 Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nat.Biotechnol.* **18** 62-65.
- Anastassiadis K, Kim J, Daigle N, Sprengel R, Scholer HR & Stewart AF 2002 A predictable ligand regulated expression strategy for stably integrated transgenes in mammalian cells in culture. *Gene* **298** 159-172.
- Anderson ED, Mourich DV & Leong JA 1996 Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **5** 105-113.
- Argenton F, Arava Y, Aronheim A & Walker MD 1996 An activation domain of the helix-loop-helix transcription factor E2A shows cell type preference in vivo in microinjected zebra fish embryos. *Mol.Cell Biol.* **16** 1714-1721.
- Asturiano JF, Sorbera LA, Ramos J, Kime DE, Carrillo M & Zanuy S 2000 Hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: an individualized female approach. *Journal of Fish Biology* **56** 1155-1172.
- Asturiano JF, Sorbera LA, Ramos J, Kime DE, Carrillo M & Zanuy S 2002 Group-synchronous ovarian development, ovulation and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Scientia Marina* **66** 273-282.
- Bakker JM, Kavelaars A, Kamphuis PJ, Cobelens PM, van Vugt HH, van Bel F & Heijnen CJ 2000 Neonatal dexamethasone treatment increases susceptibility to experimental autoimmune disease in adult rats. *J.Immunol.* **165** 5932-5937.

- Baron U, Freundlieb S, Gossen M & Bujard H 1995 Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* **23** 3605-3606.
- Baron U, Gossen M & Bujard H 1997 Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: Novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Research* **25** 2723-2729.
- Bearzotti M, Perrot E, Michard-Vanhee C, Jolivet G, Attal J, Theron MC, Puissant C, Dreano M, Kopchick JJ, Powell R & . 1992 Gene expression following transfection of fish cells. *J.Biotechnol.* **26** 315-325.
- Bejar J, Borrego JJ & Alvarez MC 1997 A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L). *Aquaculture* **150** 143-153.
- Bejar J, Hong Y & Alvarez MC 2002 An ES-like cell line from the marine fish *Sparus aurata*: characterization and chimaera production. *Transgenic Res.* **11** 279-289.
- Benfey TJ 1999 The physiology and behavior of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* **7** 39-67.
- Biering E, Villoing S, Sommerset I & Christie KE 2005 Update on viral vaccines for fish. *Dev.Biol.(Basel)* **121** 97-113.
- Billard R 1986 Spermatogenesis and Spermatology of Some Teleost Fish Species. *Reproduction Nutrition Development* **26** 877-920.
- Billard R 1989 Endocrinology and Fish Culture. *Fish Physiology and Biochemistry* **7** 49-58.
- Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P & Benmansour A 1998 Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* **249** 297-306.
- Bury NR, Sturm A, Le Rouzic P, Lethimonier C, Ducouret B, Guiguen Y, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Rafestin-Oblin ME & Prunet P 2003 Evidence for two distinct functional glucocorticoid receptors in teleost fish. *J.Mol.Endocrinol.* **31** 141-156.
- Caldovic L, Agalliu D & Hackett PB 1999 Position-independent expression of transgenes in zebrafish. *Transgenic Res.* **8** 321-334.
- Caldovic L & Hackett PB, Jr. 1995 Development of position-independent expression vectors and their transfer into transgenic fish. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **4** 51-61.
- Callus BA & Mathey-Prevot B 1999 Rapid selection of tetracycline-controlled inducible cell lines using a green fluorescent-transactivator fusion protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **257** 874-878.
- Campbell SJ, Carlotti F, Hall PA, Clark AJ & Wolf CR 1996 Regulation of the CYP1A1 promoter in transgenic mice: an exquisitely sensitive on-off system for cell specific gene regulation. *J.Cell Sci* **109 (Pt 11)** 2619-2625.
- Carvan MJ, III, Dalton TP, Stuart GW & Nebert DW 2000 Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *Ann.N.Y.Acad.Sci* **919** 133-147.

- Carvan MJ, III, Sonntag DM, Cmar CB, Cook RS, Curran MA & Miller GL 2001 Oxidative stress in zebrafish cells: potential utility of transgenic zebrafish as a deployable sentinel for site hazard ranking. *Sci Total Environ.* **274** 183-196.
- Castillo-Ureta H, Barrera-Saldana HA & Martinez-Rodriguez HG 2004 [A tetracycline-inducible gene system allows for regulated production of proteins with therapeutic potential] El sistema genico inducible por tetraciclina permite la produccion regulada de proteinas con potencial terapeutico. *Rev.Invest Clin.* **56** 748-755.
- Cavari B, Hong YH, Funkenstein B, Moay B & Schartl M 1993 All-Fish Gene Constructs for Growth-Hormone Gene-Transfer in Fish. *Fish Physiology and Biochemistry* **11** 345-352.
- Chambard JC & Pognonec P 1998 A reliable way of obtaining stable inducible clones. *Nucleic Acids Res* **26** 3443-3444.
- Chan PC, Shiu CK, Wong FW, Wong JK, Lam KL & Chan KM 2004 Common carp metallothionein-1 gene: cDNA cloning, gene structure and expression studies. *Biochim.Biophys.Acta* **1676** 162-171.
- Chan WK & Devlin RH 1993 Polymerase chain reaction amplification and functional characterization of sockeye salmon histone H3, metallothionein-B, and protamine promoters. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **2** 308-318.
- Chen JY, Chu WK, Wu HN, Hsu YL & Wu JL 2000 Infectious Pancreatic Necrosis Virus RNA Cleavage In Vitro by Hammerhead Ribozymes and Enhancement of Ribozyme Catalysis by Oligonucleotide Facilitators. **2** 364-375.
- Chen SL, Ren GC, Sha ZX & Shi CY 2004 Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* for virus isolation. *Dis.Aquat.Organ* **60** 241-246.
- Chourrout D, Guyomard R & Houdebine LM 1986 High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture* **51** 143-150.
- Chourrout D & Perrot E 1992 No transgenic rainbow trout produced with sperm incubated with linear DNA. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 282-285.
- Coe CL & Lubach GR 2005 Developmental consequences of antenatal dexamethasone treatment in nonhuman primates. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **29** 227-235.
- Combarnous Y 1992 Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocr.Rev.* **13** 670-691.
- Conrad B, Savchenko RS, Breves R & Hofemeister J 1996 A T7 promoter-specific, inducible protein expression system for *Bacillus subtilis*. *Mol.Gen.Genet.* **250** 230-236.
- Corbeil S, Kurath G & LaPatra SE 2000a Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. *Fish Shellfish.Immunol.* **10** 711-723.
- Corbeil S, LaPatra SE, Anderson ED & Kurath G 2000b Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vaccine* **18** 2817-2824.

- Davidson AE, Balciunas D, Mohn D, Shaffer J, Hermanson S, Sivasubbu S, Cliff MP, Hackett PB & Ekker SC 2003 Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Developmental Biology* **263** 191-202.
- de Graaf M, Zivkovic D & Joore J 1998 Hormone-inducible expression of secreted factors in zebrafish embryos. *Dev.Growth Differ.* **40** 577-582.
- Devlin RH, Yesaki TY, Donaldson EM, Du SJ & Hew CL 1995 Production of Germline Transgenic Pacific Salmonids with Dramatically Increased Growth-Performance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52** 1376-1384.
- Devlin RH, Biagi CA, Yesaki TY, Smailus DE & Byatt JC 2001 Growth of domesticated transgenic fish. *Nature* **409** 781-782.
- Dijkstra JM, Okamoto H, Ototake M & Nakanishi T 2001 Luciferase expression 2 years after DNA injection in glass catfish (*Kryptopterus bicirrhus*). *Fish Shellfish.Immunol.* **11** 199-202.
- Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, Itin A, Fishman GI, Carmeliet P, Goelman G & Keshet E 2002 Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *The EMBO Journal* **21** 1939-1947.
- Du SJ, Gong Z, Hew CL, Tan CH & Fletcher GL 1992a Development of an all-fish gene cassette for gene transfer in aquaculture. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 290-300.
- Du SJ, Gong ZY, Fletcher GL, Shears MA, King MJ, Idler DR & Hew CL 1992b Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology (N.Y.)* **10** 176-181.
- Dumortier J, Schonig K, Oberwinkler H, Low R, Giese T, Bujard H, Schirmacher P & Protzer U 2005 Liver-specific expression of interferon gamma following adenoviral gene transfer controls hepatitis B virus replication in mice. *Gene Ther.* **12** 668-677.
- Dunham RA, Warr G, Nichols A, Duncan PL, Angue B, Middleton D & Liu Z 2002 Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish, *Ictalurus punctatus*, possessing cecropin genes. *Marine Biotechnology* **4** 338-344.
- Ewart KV, Lin Q & Hew CL 1999 Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cell Mol.Life Sci.* **55** 271-283.
- Exon JH & South EH 2000 Dietary indole-3-carbinol alters immune functions in rats. *J.Toxicol.Environ.Health A* **59** 271-279.
- Fan L, Crodian J & Collodi P 2004 Production of zebrafish germline chimeras by using cultured embryonic stem (ES) cells. *Methods Cell Biol.* **77** 113-119.
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M & Piferrer F 2001 Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* **111** 175-195.
- Fijan N, Sulimanovic D, Bearzotti M, Muzinic D, Zwillenberg LO, Chilmonczyk S, Vautherot JF & Dekinkelin P 1983 Some Properties of the Epithelioma-Papulosum-Cyprini (Epc) Cell-Line from Carp *Cyprinus-Carpio*. *Annales de Virologie* **134** 207-220.
- Fletcher GL, Shears MA, King MJ, Davies PL & Hew CL 1988 Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. *Can.J.Fish.Aquat.Sci* **45** 352-357.

- Freundlieb S, Schirra-Muller C & Bujard H 1999 A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J.Gene Med.* **1** 4-12.
- Furth PA, St Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H & Hennighausen L 1994 Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **91** 9302-9306.
- Fussenegger M, Morris RP, Fux C, Rimann M, von Stockar B, Thompson CJ & Bailey JE 2000 Streptogramin-based gene regulation systems for mammalian cells. *Nat.Biotechnol.* **18** 1203-1208.
- Fux C, Moser S, Schlatter S, Rimann M, Bailey JE & Fussenegger M 2001 Streptogramin- and tetracycline-responsive dual regulated expression of p27(Kip1) sense and antisense enables positive and negative growth control of Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Res.* **29** E19.
- Gjedrem T 1998 Developments in fish breeding and genetics. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A-Animal Science* 19-26.
- Gomez-Chiarri M & Chiaverini LA 1999 Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture. *Genetic Analysis-Biomolecular Engineering* **15** 121-124.
- Gong Z, Ewart KV, Hu Z, Fletcher GL & Hew CL 1996 Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences. *J.Biol.Chem.* **271** 4106-4112.
- Gong Z, Hew CL & Vielkind JR 1991 Functional analysis and temporal expression of promoter regions from fish antifreeze protein genes in transgenic Japanese medaka embryos. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 64-72.
- Gong Z, Wan H, Tay TL, Wang H, Chen M & Yan T 2003 Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **308** 58-63.
- Gopalkrishnan RV, Christiansen KA, Goldstein NI, DePinho RA & Fisher PB 1999 Use of the human EF-1alpha promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **27** 4775-4782.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA & Ruddle FH 1980 Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A* **77** 7380-7384.
- Gossen M & Bujard H 1992 Tight Control of Gene-Expression in Mammalian-Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** 5547-5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W & Bujard H 1995 Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268** 1766-1769.
- Gould DJ, Berenstein M, Dreja H, Ledda F, Podhajcer OL & Chernajovsky Y 2000 A novel doxycycline inducible autoregulatory plasmid which displays "on"/"off" regulation suited to gene therapy applications. *Gene Ther.* **7** 2061-2070.

- Grabher C & Wittbrodt J 2004 Efficient activation of gene expression using a heat-shock inducible Gal4/Vp16-UAS system in medaka. *BMC.Biotechnol.* **4** 26.
- Grill MA, Bales MA, Fought AN, Rosburg KC, Munger SJ & Antin PB 2003 Tetracycline-inducible system for regulation of skeletal muscle-specific gene expression in transgenic mice. *Transgenic Res.* **12** 33-43.
- Guillen L, Berlanga J, Valenzuela CM, Morales A, Toledo J, Estrada MP, Puentes P, Hayes O & Fuente J 1999 Safety evaluation of transgenic tilapia with accelerated growth. *Mar.Biotechnol.(NY)* **1** 2-14.
- Hans S, Scheer N, Riedl I, Weizsacker E, Blader P & Campos-Ortega JA 2004 her3, a zebrafish member of the hairy-E(spl) family, is repressed by Notch signalling. *Development* **131** 2957-2969.
- Hansen E, Fernandes K, Goldspink G, Butterworth P, Umeda PK & Chang KC 1991 Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Lett.* **290** 73-76.
- Hew C, Poon R, Xiong F, Gauthier S, Shears M, King M, Davies P & Fletcher G 1999a Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene. *Transgenic Res.* **8** 405-414.
- Hew C, Poon R, Xiong F, Gauthier S, Shears M, King M, Davies P & Fletcher G 1999b Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene. *Transgenic Res.* **8** 405-414.
- Hew CL, Davies PL & Fletcher G 1992 Antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 309-317.
- Hew CL, Fletcher GL & Davies PL 1995 Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. *Journal of Fish Biology* **47 (Suppl. A)**.
- Hoffmann A, Villalba M, Journot L & Spengler D 1997 A novel tetracycline-dependent expression vector with low basal expression and potent regulatory properties in various mammalian cell lines. *Nucleic Acids Res* **25** 1078-1079.
- Hofmann A, Nolan GP & Blau HM 1996 Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** 5185-5190.
- Hong Y, Winkler C & Scharl M 1993 Development of a heavy metal-inducible fish-specific expression vector for gene transfer in vitro and in vivo. *Aquaculture* **11** 215-226.
- Hong Y, Winkler C & Scharl M 1996 Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*). *Mech.Dev.* **60** 33-44.
- Hong Y, Winkler C & Scharl M 1998 Production of medakafish chimeras from a stable embryonic stem cell line. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A* **95** 3679-3684.
- Hostetler HA, Collodi P, Devlin RH & Muir WM 2004 Improved phytate phosphorus utilization by Japanese Medaka transgenic for the *Aspergillus niger* phytase gene. *Transgenic Res.(submitted)*.
- Houssay BA 1930 Acción sexual de la hipófisis en los peces y reptiles. *Rev.Soc.Arg.Biol.* **106** 686-688.

- Howard RD, DeWoody JA & Muir WM 2004 Transgenic male mating advantage provides opportunity for Trojan gene effect in a fish. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A* **101** 2934-2938.
- Howe JR, Skryabin BV, Belcher SM, Zerillo CA & Schmauss C 1995 The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J.Biol.Chem.* **270** 14168-14174.
- Hu GB, Cong RS, Fan TJ & Mei XG 2004 Induction of apoptosis in a flounder gill cell line by lymphocystis disease virus infection. *J.Fish Dis.* **27** 657-662.
- Hwang G, Muller F, Rahman MA, Williams DW, Murdock PJ, Pasi KJ, Goldspink G, Farahmand H & Maclean N 2004 Fish as Bioreactors: Transgene Expression of Human Coagulation Factor VII in Fish Embryos. *Mar.Biotechnol.(NY)* .
- Inoue K, Akita N, Shiba T, Satake M & Yamashita S 1992 Metal-inducible activities of metallothionein promoters in fish cells and fry. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **185** 1108-1114.
- Israel DI & Kaufman RJ 1989 Highly inducible expression from vectors containing multiple GRE's in CHO cells overexpressing the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res.* **17** 4589-4604.
- Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH & Izsvak Z 1997 Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* **91** 501-510.
- Izumi M & Gilbert DM 1999 Homogeneous tetracycline-regulatable gene expression in mammalian fibroblasts. *J Cell Biochem* **76** 280-289.
- Jiang W, Zhou L, Breyer B, Feng T, Cheng H, Haydon R, Ishikawa A & He TC 2001 Tetracycline-regulated gene expression mediated by a novel chimeric repressor that recruits histone deacetylases in mammalian cells. *J Biol Chem* **276** 45168-45174.
- Jones SN, Jones PG, Ibarguen H, Caskey CT & Craigen WJ 1991 Induction of the Cyp1a-1 dioxin-responsive enhancer in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* **19** 6547-6551.
- Kamer I, Douek J, Tom M & Rinkevich B 2003 Metallothionein induction in the RTH-149 cell line as an indicator for heavy metal bioavailability in a brackish environment: assessment by RT-competitive PCR. *Arch.Environ.Contam Toxicol.* **45** 86-91.
- Kamper MR, Gohla G & Schluter G 2002 A novel positive tetracycline-dependent transactivator (rtTA) variant with reduced background activity and enhanced activation potential. *FEBS Lett.* **517** 115-120.
- Kanellos T, Sylvester ID, Howard CR & Russell PH 1999 DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish. *Vaccine* **17** 965-972.
- Kenny PA, Enver T & Ashworth A 2002 Retroviral vectors for establishing tetracycline-regulated gene expression in an otherwise recalcitrant cell line. *BMC.Mol.Biol.* **3** 13.
- Kinoshita M, Yamauchi M, Sasanuma M, Ishikawa Y, Osada T, Inoue K, Wakamatsu Y & Ozato K 2003 A transgene and its expression profile are stably transmitted to offspring in transgenic medaka generated by the particle gun method. *Zoological Science* **20** 869-875.

- Kirchhoff S, Koster M, Wirth M, Schaper F, Gossen M, Bujard H & Hauser H 1995 Identification of Mammalian-Cell Clones Exhibiting Highly Regulated Expression from Inducible Promoters. *Trends in Genetics* **11** 219-220.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lubbert H & Bujard H 1996 Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** 10933-10938.
- Knott A, Garke K, Urlinger S, Guthmann J, Muller Y, Thellmann M & Hillen W 2002 Tetracycline-dependent gene regulation: combinations of transregulators yield a variety of expression windows. *Biotechniques* **32** 796, 798, 800.
- Ko MS, Takahashi N, Sugiyama N & Takano T 1989 An auto-inducible vector conferring high glucocorticoid inducibility upon stable transformant cells. *Gene* **84** 383-389.
- Krasnov A, Pitkanen TI & Molsa H 1999 Gene transfer for targeted modification of salmonid fish metabolism. *Genet.Anal.* **15** 115-119.
- Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR & Chambon P 1987 Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* **51** 941-951.
- Kurath G 2005 Overview of recent DNA vaccine development for fish. *Dev.Biol.(Basel)* **121** 201-213.
- Lai YS, John JA, Lin CH, Guo IC, Chen SC, Fang K, Lin CH & Chang CY 2003 Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and their susceptibility to grouper irido- and nodaviruses. *J.Fish Dis.* **26** 31-42.
- Langenau DM, Feng H, Berghmans S, Kanki JP, Kutok JL & Look AT 2005 Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** 6068-6073.
- Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, Kutok JL, Aster JC, Kanki JP, Lin S, Prochownik E, Trede NS, Zon LI & Look AT 2003 Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science* **299** 887-890.
- Langenau DM & Zon LI 2005 The zebrafish: A new model of T-cell and thymic development. *Nature Reviews Immunology* **5** 307-317.
- Lee KY, Huang H, Ju B, Yang Z & Lin S 2002 Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. *Nat.Biotechnol.* **20** 795-799.
- Lee PC, Goodrich M, Struve M, Yoon HI & Weber D 1992 Liver and brain glucocorticoid receptor in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: down-regulation by dexamethasone. *Gen.Comp Endocrinol.* **87** 222-231.
- Li H & Zhang S 2001 In vitro cytotoxicity of the organophosphorus pesticide parathion to FG-9307 cells. *Toxicol.In Vitro* **15** 643-647.
- Lin S, Yang S & Hopkins N 1994 lacZ expression in germline transgenic zebrafish can be detected in living embryos. *Dev.Biol.* **161** 77-83.

- Liu ZJ, Moav B, Faras AJ, Guise KS, Kapuscinski AR & Hackett PB 1990 Development of expression vectors for transgenic fish. *Biotechnology (N.Y.)* **8** 1268-1272.
- Lopez A, Fernandez-Alonso M, Rocha A, Estepa A & Coll JM 2001 Transfection of epithelioma papulosum cyprini (EPC) carp cells. *Biotechnology Letters* **23** 481-487.
- Lorenzen N, Cupit PM, Einer-Jensen K, Lorenzen E, Ahrens P, Secombes CJ & Cunningham C 2000 Immunoprophylaxis in fish by injection of mouse antibody genes. *Nat.Biotechnol.* **18** 1177-1180.
- Lorenzen N, Lorenzen E & Einer-Jensen K 2001 Immunity to viral haemorrhagic septicaemia (VHS) following DNA vaccination of rainbow trout at an early life-stage. *Fish Shellfish.Immunol.* **11** 585-591.
- Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K & LaPatra SE 2002 DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish.Shellfish.Immunol.* **12** 439-453.
- Luo D & McKeown BA 1991 The effect of thyroid hormone and glucocorticoids on carp growth hormone-releasing factor (GRF)-induced growth hormone (GH) release in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem.Physiol A* **99** 621-626.
- Maclean N 1998 Regulation and exploitation of transgenes in fish. *Mutat.Res.* **399** 255-266.
- Maclean N 2003 Genetically modified fish and their effects on food quality and human health and nutrition. *Trends in Food Science & Technology* **14** 242-252.
- Maclean N, Iyengar A, Rahman A, Sulaiman Z & Penman D 1992 Transgene transmission and expression in rainbow trout and tilapia. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 355-365.
- Maclean N, Rahman MA, Sohm F, Hwang G, Iyengar A, Ayad H, Smith A & Farahmand H 2002 Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene* **295** 265-277.
- Maddison K & Clarke AR 2005 New approaches for modelling cancer mechanisms in the mouse. *J.Pathol.* **205** 181-193.
- Martinez R, Estrada MP, Berlanga J, Guillen I, Hernandez O, Cabrera E, Pimentel R, Morales R, Herrera F, Morales A, Pina JC, Abad Z, Sanchez V, Melamed P, Leonart R & de la FJ 1996 Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **5** 62-70.
- Mateos J, Mananos E, Carrillo M & Zanuy S 2002 Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **132** 75-86.
- Mateos J, Mananos E, Martinez-Rodriguez G, Carrillo M, Querat B & Zanuy S 2003 Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (alpha, FSHbeta, and LHbeta) and their expression during the reproductive cycle. *Gen.Comp Endocrinol.* **133** 216-232.
- Mattingly CJ, McLachlan JA & Toscano WA, Jr. 2001 Green fluorescent protein (GFP) as a marker of aryl hydrocarbon receptor (AhR) function in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environ.Health Perspect.* **109** 845-849.

- Mayer GD, Leach A, Kling P, Olsson PE & Hogstrand C 2003 Activation of the rainbow trout metallothionein-A promoter by silver and zinc. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **134** 181-188.
- Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Kaiser H, Brack AR, Kandolf R & Kupper JH 2004 Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies. *Anal.Biochem.* **334** 9-19.
- Mikalsen AB, Torgersen J, Alestrom P, Hellemann AL, Koppang EO & Rimstad E 2004 Protection of atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Dis.Aquat.Organ* **60** 11-20.
- Moav B, Liu Z, Caldovic LD, Gross ML, Faras AJ & Hackett PB 1993 Regulation of expression of transgenes in developing fish. *Transgenic Res.* **2** 153-161.
- Mohammadi S & Hawkins RE 1998 Efficient transgene regulation from a single tetracycline-controlled positive feedback regulatory system. *Gene Ther* **5** 76-84.
- Molina A, Carpeaux R, Martial JA & Muller M 2002 A transformed fish cell line expressing a green fluorescent protein-luciferase fusion gene responding to cellular stress. *Toxicol.In Vitro* **16** 201-207.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Jolicoeur P & Massie B 1997 Use of a dicistronic expression cassette encoding the green fluorescent protein for the screening and selection of cells expressing inducible gene products. *Biotechniques* **22** 150-161.
- Muir WM & Howard RD 1999 Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success: Sexual selection and the Trojan gene hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96** 13853-13856.
- Muller F, Blader P & Strahle U 2002 Search for enhancers: teleost models in comparative genomic and transgenic analysis of cis regulatory elements. *Bioessays* **24** 564-572.
- Muller F, Ivics Z, Erdelyi F, Papp T, Varadi L, Horvath L & Maclean N 1992 Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 276-281.
- Munro, A. D., Scott, A. P., and Lam, T. J. Reproductive Seasonality in Teleosts: Enviromental Influences. CRC Press, Boca Raton, FL. 254. 1990.
Ref Type: Conference Proceeding
- No D, Yao TP & Evans RM 1996 Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **93** 3346-3351.
- Ogino Y, Itakura T, Kato H, Aoki J & Sato M 1999 Functional Analysis of Promoter Region from Eel Cytochrome P450 1A1 Gene in Transgenic Medaka. *Mar.Biotechnol.(NY)* **1** 364-370.
- Okamura H, Watanabe T, Aoyama I & Hasobe M 2002 Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere* **46** 945-951.
- Olsson PE, Kling P, Erkell LJ & Kille P 1995 Structural and functional analysis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) metallothionein-A gene. *Eur.J.Biochem.* **230** 344-349.

- Oram JF, Vaughan AM & Stocker R 2001 ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol. *J.Biol.Chem.* **276** 39898-39902.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC & Evans RM 1982 Dramatic Growth of Mice That Develop from Eggs Micro-Injected with Metallothioneine-Growth Hormone Fusion Genes. *Nature* **300** 611-615.
- Paulus W, Baur I, Boyce FM, Breakefield XO & Reeves SA 1996 Self-contained, tetracycline-regulated retroviral vector system for gene delivery to mammalian cells. *Journal of Virology* **70** 62-67.
- Paulus W, Baur I, Oberer DM, Breakefield XO & Reeves SA 1997 Regulated expression of the diphtheria toxin A gene in human glioma cells using prokaryotic transcriptional control elements. *J.Neurosurg.* **87** 89-95.
- Pelegrin P, Chaves-Pozo E, Mulero V & Meseguer J 2004 Production and mechanism of secretion of interleukin-1 beta from the marine fish gilthead seabream. *Developmental and Comparative Immunology* **28** 229-237.
- Pierce AL, Fukada H & Dickhoff WW 2005 Metabolic hormones modulate the effect of growth hormone (GH) on insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA level in primary culture of salmon hepatocytes. *J.Endocrinol.* **184** 341-349.
- Pierce JG & Parsons TF 1981 Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu.Rev.Biochem.* **50** 465-495.
- Pitkanen TI, Krasnov A, Reinisalo M & Molsa H 1999 Transfer and expression of glucose transporter and hexokinase genes in salmonid fish. *Aquaculture* **173** 319-332.
- Pombinho AR, Laize V, Molha DM, Marques SM & Cancela ML 2004 Development of two bone-derived cell lines from the marine teleost *Sparus aurata*; evidence for extracellular matrix mineralization and cell-type-specific expression of matrix Gla protein and osteocalcin. *Cell Tissue Res.* **315** 393-406.
- Rahman A & Maclean N 1992 Fish transgene expression by direct injection into fish muscle. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 286-289.
- Rahman MA, Mak R, Ayad H, Smith A & Maclean N 1998 Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Res.* **7** 357-369.
- Raz E, Watanabe A, Baird SM, Eisenberg RA, Parr TB, Lotz M, Kipps TJ & Carson DA 1993 Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **90** 4523-4527.
- Regal PJ 1987 Models of genetically engineered organisms and their ecological impact. *Recomb.DNA Tech.Bull.* **10** 67-85.
- Rice CD & Roszell LE 1998 Tributyltin modulates 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-126)-induced hepatic CYP1A activity in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J.Toxicol.Enviroin.Health A* **55** 197-212.

- Rocha, A., Gómez, A., and Carrillo, M. Cloning of a gonadal follicle stimulating hormone receptor cDNA from the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. 2003. Abstract.
- Rocha, A., Gómez, A., and Carrillo, M. Cloning of a gonadal luteinizing hormone receptor cDNA from the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. 5th International Symposium on Fish Endocrinology . 2004. Abstract.
- Rolland RM 2000 A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. *Journal of Wildlife Diseases* **36** 615-635.
- Rose SD & MacDonald RJ 1997 Integration of tetracycline regulation into a cell-specific transcriptional enhancer. *J.Biol.Chem.* **272** 4735-4739.
- Rubinchik S, Woraratanadharm J, Yu H & Dong JY 2005 New complex Ad vectors incorporating both rtTA and tTS deliver tightly regulated transgene expression both in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **12** 504-511.
- Sadowski I, Ma J, Triezenberg S & Ptashne M 1988 GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335** 563-564.
- Samson SL & Gedamu L 1995 Metal-responsive elements of the rainbow trout metallothionein-B gene function for basal and metal-induced activity. *J.Biol.Chem.* **270** 6864-6871.
- Sarmasik A, Warr G & Chen TT 2002 Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Marine Biotechnology* **4** 310-322.
- Scheer N, Riedl I, Warren JT, Kuwada JY & Campos-Ortega JA 2002 A quantitative analysis of the kinetics of Gal4 activator and effector gene expression in the zebrafish. *Mech.Dev.* **112** 9-14.
- Schulte PM, Powers DA & Scharl M 1998 Efficient gene transfer into Xiphophorus muscle and melanoma by injection of supercoiled plasmid DNA. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **7** 241-247.
- Schulz RW, Vischer HF, Cavaco JE, Santos EM, Tyler CR, Goos HJ & Bogerd J 2001 Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **129** 407-417.
- Scimienti CR, Baba EJ & Calos MP 2000 An extrachromosomal tetracycline-regulatable system for mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **28** E80.
- Scudiero R, Carginale V, Capasso C, Riggio M, Filosa S & Parisi E 2001 Structural and functional analysis of metal regulatory elements in the promoter region of genes encoding metallothionein isoforms in the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* (icefish). *Gene* **274** 199-208.
- Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N & Schatz DG 1995 A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** 6522-6526.
- Sin FYT, Bartley AL, Walker SP, Sin IL, Symonds JE, Hawke L & Hopkins CL 2003 Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-lacZ DNA. *Aquaculture* **117** 57-69.
- Stebbins MJ, Urlinger S, Byrne G, Bello B, Hillen W & Yin JC 2001 Tetracycline-inducible systems for *Drosophila*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** 10775-10780.

- Stebbins MJ & Yin JC 2001 Adaptable doxycycline-regulated gene expression systems for *Drosophila*. *Gene* **270** 103-111.
- Strathdee CA, McLeod MR & Hall JR 1999 Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* **229** 21-29.
- Szafranski P, Mello CM, Sano T, Smith CL, Kaplan DL & Cantor CR 1997 A new approach for containment of microorganisms: dual control of streptavidin expression by antisense RNA and the T7 transcription system. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **94** 1059-1063.
- Tan JH & Chan WK 1997 Efficient gene transfer into zebrafish skeletal muscle by intramuscular injection of plasmid DNA. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **6** 98-109.
- Tang DC, de Vit M & Johnston SA 1992 Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356** 152-154.
- Thummel R, Burket CT, Brewer JL, Sarras MP, Jr., Li L, Perry M, McDermott JP, Sauer B, Hyde DR & Godwin AR 2005 Cre-mediated site-specific recombination in zebrafish embryos. *Dev.Dyn.* **233** 1366-1377.
- Triezenberg SJ, Kingsbury RC & McKnight SL 1988 Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* **2** 718-729.
- Tripathy SK, Svensson EC, Black HB, Goldwasser E, Margalith M, Hobart PM & Leiden JM 1996 Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **93** 10876-10880.
- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H & Hillen W 2000a Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** 7963-7968.
- Urlinger S, Helbl V, Guthmann J, Pook E, Grimm S & Hillen W 2000b The p65 domain from NF-kappaB is an efficient human activator in the tetracycline-regulatable gene expression system. *Gene* **247** 103-110.
- Uzbekova S, Chyb J, Ferriere F, Bailhache T, Prunet P, Alestrom P & Breton B 2000 Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon. *J.Mol.Endocrinol.* **25** 337-350.
- Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P, Leysen JE & Haegeman G 2001 Evaluation of the tetracycline- and ecdysone-inducible systems for expression of neurotransmitter receptors in mammalian cells. *Eur.J Neurosci.* **14** 968-976.
- Vanhoenacker P, Gommeren W, Luyten WH, Leysen JE & Haegeman G 1997 Stable, high-level expression of human serotonin receptors in L929 cells using an inducible expression system. *Receptors.Channels* **5** 125-137.
- Verri T, Argenton F, Tomanin R, Scarpa M, Storelli C, Costa R, Colombo L & Bortolussi M 1997 The bacteriophage T7 binary system activates transient transgene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **237** 492-495.
- Verri T, Ingrosso L, Chiloiro R, Danieli A, Zonno V, Alifano P, Romano N, Scapigliati G, Vilella S & Storelli C 2003 Assessment of DNA vaccine potential for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by intramuscular injection of a reporter gene. *Fish Shellfish.Immunol.* **15** 283-295.

- Wakamatsu Y, Pristysznyuk S, Kinoshita M, Tanaka M & Ozato K 2001 The see-through medaka: a fish model that is transparent throughout life. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** 10046-10050.
- Wang R, Zhang P, Gong Z & Hew CL 1995 Expression of the antifreeze protein gene in transgenic goldfish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaptation. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **4** 20-26.
- Wang TM, Chen YH, Liu CF & Tsai HJ 2002 Functional analysis of the proximal promoter regions of fish rhodopsin and myf-5 genes using transgenesis. *Mar.Biotechnol.(NY)* **4** 247-255.
- Wang Y, O'Malley BW, Jr., Tsai SY & O'Malley BW 1994 A Regulatory System for Use in Gene Transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91** 8180-8184.
- Wells KD, Foster JA, Moore K, Pursel VG & Wall RJ 1999 Codon optimization, genetic insulation, and an rtTA reporter improve performance of the tetracycline switch. *Transgenic Res.* **8** 371-381.
- Wergeland HI & Jakobsen RA 2001 A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV). *Dis.Aquat.Organ* **44** 183-190.
- Winn RN 2001 Transgenic fish as models in environmental toxicology. *ILAR.J.* **42** 322-329.
- Winn RN, Norris M, Muller S, Torres C & Brayer K 2001 Bacteriophage lambda and plasmid pUR288 transgenic fish models for detecting in vivo mutations. *Mar.Biotechnol.(NY)* **3** S185-S195.
- Winn RN, Norris MB, Brayer KJ, Torres C & Muller SL 2000 Detection of mutations in transgenic fish carrying a bacteriophage lambda cII transgene target. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **97** 12655-12660.
- Winnemoeller D, Wellbrock C & Scharl M 2005 Activating mutations in the extracellular domain of the melanoma inducing receptor Xmrk are tumorigenic in vivo. *Int.J.Cancer.*
- Wise JP, Winn RN & Renfro JL 2002 Generating new marine cell lines and transgenic species--conference summary. *J.Exp.Zool.* **292** 217-220.
- Wittbrodt J, Shima A & Scharl M 2002 Medaka--a model organism from the far East. *Nat.Rev.Genet.* **3** 53-64.
- Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P & Jani A 1992 Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum.Mol.Genet.* **1** 363-369.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A & Felgner PL 1990 Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247** 1465-1468.
- Xu C, Wu G, Zohar Y & Du SJ 2003 Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J.Exp.Biol.* **206** 4067-4079.
- Yan CH & Chan KM 2002 Characterization of zebrafish metallothionein gene promoter in a zebrafish caudal fin cell-line, SJD. 1. *Mar.Environ.Res.* **54** 335-339.
- Yan CH & Chan KM 2004 Cloning of zebrafish metallothionein gene and characterization of its gene promoter region in HepG2 cell line. *Biochim.Biophys.Acta* **1679** 47-58.

- Yao F, Svensjo T, Winkler T, Lu M, Eriksson C & Eriksson E 1998 Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* **9** 1939-1950.
- Yoshizaki G, Sakatani S, Tominaga H & Takeuchi T 2000 Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Dev.* **55** 364-371.
- Zafarullah M, Bonham K & Gedamu L 1988 Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal-responsive region. *Mol. Cell Biol.* **8** 4469-4476.
- Zbikowska HM 2003 Fish can be first--advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Res.* **12** 379-389.
- Zhang XY, Su BL, Li H, Bai R, Xu ZH & Li CC 2004 A single tetracycline-regulated vector devised for controlled insulin gene expression. *Chin Med. Sci J.* **19** 266-269.
- Zhu Z, Ma B, Homer RJ, Zheng T & Elias JA 2001 Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **276** 25222-25229.
- Zhu Z, Zheng T, Lee CG, Homer RJ & Elias JA 2002 Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **13** 121-128.
- Zohar Y 1989a Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction growth, and smoltification. *Fish Physiol. Biochem.* **7** 395-405.
- Zohar Y 1989b Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. In *In Shilo, M., Sarig, S. (Eds.), Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends. CRC Perss, Boca Raton*, pp 65-119.
- Zohar Y & Mylonas CC 2001 Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* **197** 99-136.

OBJETIVOS GENERALES

OBJETIVOS

El *objetivo global* de este trabajo es la evaluación y el desarrollo de metodología relacionada con aspectos de la transferencia génica en peces.

En mamíferos esta metodología está mucho más desarrollada, y pese a todo sigue habiendo deficiencias en la técnica que dificultan la obtención de organismos transgénicos en algunos casos. En peces, donde este tipo de investigación se han desarrollado con menor intensidad, y siempre al amparo de los avances conseguidos en especies modelo, como medaka y pez cebra, las dificultades encontradas al establecer estas técnicas, son mucho mayores.

Los *objetivos parciales de esta tesis*, se basan en la búsqueda de soluciones o alternativas para algunos puntos críticos, que sienten bases para poder usar, en el futuro, y de manera eficaz la metodología de la transferencia génica en especies comerciales, como la lubina (*Dicentrarchus labrax*). A continuación, se enumeran estos objetivos:

1.- Evaluación de los parámetros necesarios para la introducción de DNA exógeno en tejido somático de la lubina, que permita la expresión temporal de los genes en el animal.

2.- Evaluación de este método de transferencia génica somática en aplicaciones fisiológicas, mediante la inyección de una gonadotrofina recombinante en el músculo de lubina.

3.- Establecer un método que permita el control temporal de la expresión de genes exógenos en peces. Para cumplir este objetivo se ha evaluado, puesto a punto y adaptado el sistema de regulación por tetraciclina para su uso tanto *in vivo*, mediante inyección en músculo de lubina, como *in vitro*, mediante su introducción y establecimiento en una línea celular de pez.

4.- Establecer las condiciones necesarias para poder transfectar una línea celular procedente de lubina, y evaluar su utilidad potencial para diversas aplicaciones biotecnológicas.

CAPÍTULO 1

TRANSFERENCIA GÉNICA SOMÁTICA

1.1.- INYECCIÓN Y EXPRESIÓN DE DNA PLASMÍDICO EN MÚSCULO DE LUBINA

1.1.1.- INTRODUCCIÓN

Wolff y colaboradores desarrollaron hace más de una década un nuevo concepto de transferencia génica transitoria (Wolff *et al.* 1990). La técnica esta basada en la introducción de DNA plasmídico desnudo en tejido somático de un organismo adulto. Los genes contenidos en el plásmido se expresan así de manera eficiente, aunque no se integran en el genoma de las células, y pueden mantenerse en muchos casos durante largos periodos de tiempo (Wolff *et al.* 1992; Dijkstra *et al.* 2001). La inyección de DNA plasmídico en tejido somático de animales adultos se llevó a cabo por primera vez en ratón. El resultado de diversos estudios en ratón, y también en peces (Hansen *et al.* 1991; Rahman & Maclean 1992; Gomez-Chiarri *et al.* 1996; Anderson *et al.* 1996a; Tan & Chan 1997), ha mostrado que el músculo es un tejido diana adecuado para la inyección de DNA plasmídico.

En mamíferos esta técnica se ha optimizado para su uso en terapia génica, dirigiéndose mayormente a músculo y otros tejidos que pudieran manifestar enfermedades propias. En peces, la aplicación más prometedora es el uso de vacunas de DNA para inmunización (Anderson *et al.* 1996b; Heppell & Davis 2000; Corbeil *et al.* 2000b).

El manejo de stocks de peces que no padezcan enfermedades, es uno de los principales retos para la acuicultura. Es deseable que los peces sean inmunologicamente competentes, y es necesario poder controlar las enfermedades que les afectan. La transferencia génica en peces como método de vacunación, puede ayudar a controlar algunas enfermedades (Boudinot *et al.* 1998; Corbeil *et al.* 2000a; Corbeil *et al.* 2000b). Este tipo de estrategia, ha resultado eficiente para combatir infecciones víricas en especies comerciales como la trucha (Boudinot *et al.* 1998; Lorenzen *et al.* 1998; Corbeil *et al.* 2000a; Corbeil *et al.* 2000b) y el salmón (Mikalsen *et al.* 2004), mediante la inyección de un gen que codifique una proteína antigénica de la cubierta del virus. También en trucha, se ha conseguido protección inmunológica frente al virus de la septicemia hemorrágica (VHSV) mediante la inyección en músculo

de una construcción que codifica un anticuerpo de una sola cadena (Lorenzen *et al.* 2000).

La inyección de DNA en músculo tiene, potencialmente, otras aplicaciones además de la vacunación. Una de ellas, también relacionada con la salud de los animales, es el refuerzo del sistema inmunitario mediante la expresión de genes relacionados con el mismo, como ya se ha demostrado en mamíferos (Raz *et al.* 1993). También puede servir esta técnica para conseguir sintetizar y secretar proteínas al torrente sanguíneo, al igual que en mamíferos (Tripathy *et al.* 1996; Tokui *et al.* 1997). En estudios básicos, se ha demostrado el potencial de la inyección de DNA para analizar promotores, tanto en mamíferos como en peces (Schulte *et al.* 1997). Además, también puede utilizarse para evaluar construcciones de DNA antes de emprender la creación de transgénicos estables (Rahman & Maclean 1992).

Esta técnica se ha ensayado mayormente en peces de agua dulce. En especies marinas, sólo existe un trabajo donde, mediante la inyección de un gen indicador en músculo de dorada (*Spaurus aurata*), se establecen los parámetros que potencialmente permitirán el uso de vacunas de DNA en esta especie (Verri *et al.* 2003). Al igual que la dorada, otra especie de gran importancia para la acuicultura mediterránea es la lubina (*Dicentrarchus labrax*), en la que no se han ensayado hasta la fecha técnicas de transferencia génica.

Por todo esto, los objetivos de este trabajo son determinar, por primera vez, los parámetros más óptimos para la inyección de DNA plasmídico en músculo de lubina: dosis y formulación del DNA, lugar y estabilidad de la expresión tras la inyección, condiciones de temperatura y uso de distintos promotores. Para ello se han utilizado construcciones conteniendo el gen indicador luciferasa, lo que ha permitido determinar de una manera cuantitativa, cuales serían las condiciones a utilizar en futuras aplicaciones, ya sea como método de vacunación y refuerzo del sistema inmune, o como medio de sintetizar y secretar una proteína a la sangre.

1.1.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Peces

Se usaron ejemplares jóvenes de lubina (*Dicentrarchus labrax*), entre 50 y 100 gramos, para todos los experimentos. Los peces se mantuvieron en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (17-20°C).

Plásmidos

pCMVtk-luc+ (Altschmied & Duschl 1997), **pCMVtk-lacZ** y **pRL-CMV** que expresan constitutivamente la luciferasa de luciérnaga, la β -galactosidasa de *Escherichia coli*, y la luciferasa de *Renilla reniformis* respectivamente. El plásmido **β -actin-luc+**, se construyó insertando un fragmento *SpeI-NcoI* de 4.6 kb del plásmido pP3PalacZ-carp β A (Alam *et al.* 1996), que contenía secuencias reguladoras (3.3 kb de promotor, primer exón no traducido y primer intrón) del gen de la actina β de carpa, en el plásmido pLUC+ (Altschmied & Duschl 1997), para dirigir la expresión del gen de la luciferasa de luciérnaga.

Obtención de DNA plasmídico

Para la propagación de los diferentes plásmidos se transformó *E. coli* DH5 α siguiendo el método de Hanahan (Hanahan 1983). El DNA plasmídico se purificó utilizando cromatografía de intercambio aniónico (Qiagen Inc. Chatsworth, Calif).

Inyección de plásmidos

El DNA se diluyó en tampón fosfato salino (PBS) a la concentración requerida, y se añadió pintura acrílica para poder reconocer el sitio de inyección. Usando una jeringa hipodérmica de insulina y una aguja de 26 ½ Gauge, 100 μ l de esta solución se inyectaron en el músculo, en la parte rostro-ventral de la aleta dorsal, por encima de la línea lateral (fig 1.1.1). Los peces se anestesiaron por inmersión en 2 - fenoxietanol al 0.02% (Sigma).

Las inyecciones de DNA con polivinilpirrolidona (PVP PM medio 40000, Sigma P-0930) se formularon según un procedimiento previamente establecido (Mumper *et al.* 1998). Resumidamente, se mezcló el DNA plasmídico y la PVP (ratio 1:17 p/p), y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La concentración final fue de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para el DNA plasmídico y de 5% para la PVP. Se añadió NaCl hasta una concentración final de 150 mM. El pH final de la solución fue de 4.0.

Inyección de miotóxicos

El agente miotóxico bupivacaína (Lab. B. Braun Medical SA) se diluyó en PBS hasta la concentración requerida, y se inyectó en el músculo sobre la línea lateral a razón de 2.5 μl por gramo de peso del animal. La cardiotoxina (toxina de serpiente, Sigma) se inyectó de la misma manera a una concentración de 10 μM en PBS.



Fig 1.1.1.- Inyección del DNA plasmídico en músculo de lubina

Ensayo de la actividad luciferasa

Las muestras de músculo (100-300 mg) se homogenizaron en tres volúmenes de *Reporter Lysis Buffer* o *Passive Lysis Buffer* (Promega). Posteriormente se centrifugaron durante 20 min a 15000 g. Se tomaron 20 µl de este lisado para medir la actividad luciferasa de luciérnaga con 200 µl del reactivo luciferina (20 mM TricinaKOH, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 8 mM MgCl₂, 33.3 mM DTT, 270 µM CoA, 530 µM ATP, 400 µM luciferina). Para medir las actividades luciferasa de luciérnaga y de *Renilla reniformis* en un mismo extracto se usó el *kit Dual Luciferase Assay* (Promega). La luz emitida se midió en un luminómetro (*Junior*, EG&G, Berthold) y se expresó como unidades relativas de luz (RLUs). Para determinar la cantidad de luciferasa presente en las muestras, se utilizaron curvas patrón de actividad luciferasa realizadas con distintas cantidades de luciferasa purificada (Sigma). La cantidad de proteína se midió mediante el reactivo de Bradford (Bio-Rad), utilizando albúmina de suero bovino (Sigma) como patrón. La actividad luciferasa relativa es el cociente entre la actividad luciferasa de luciérnaga y la actividad luciferasa de *Renilla reniformis*.

Detección histoquímica de la β-galactosidasa

Se extrajo una porción de músculo alrededor del sitio de inyección, y a continuación se fijó con una solución al 2% de paraformaldehído durante 6 horas a 4°C. Después se sumergió en una solución de permeabilización (tampón fosfato sódico 0.1M pH7.3, 70 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.01% deoxicolato sódico, 0.02% Nonidet-40) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó 3 veces en PBS durante 30 min. La detección de la actividad β-galactosidasa se llevó a cabo incubando las muestras en una solución que contenía: 20 mM K₃Fe(CN)₆, 20 mM K₄Fe(CN)₆, 2 mM MgCl₂ y 1 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase (X-gal, stock 40x en DMSO) en PBS a 37°C durante 16 horas en total oscuridad. Posteriormente, los bloques de músculo se aclararon con PBS, se deshidrataron y se embebieron en resina 2-hidroxietilmetacrilato (Technovit 7100, Heraeus Kultzer). Finalmente, se seccionaron en láminas de un grosor de 4 µM, y se tiñeron con hematoxilina y eosina (0.5%).

Extracción de DNA de tejidos y análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los animales se sacrificaron por inmersión en una dosis letal de 2-fenoxietanol. Todos los instrumentos quirúrgicos empleados se limpiaron con lejía al 10% antes y después de recoger cada muestra para PCR. Las muestras de tejido se mantuvieron a -70°C hasta proceder a la extracción del DNA. Para obtener el DNA se trituró un pequeño trozo de cada tejido, y se incubó en 1 ml de Tripsina/EDTA (Gibco BRL) durante 30 min agitando repetidamente. El tejido no digerido se eliminó mediante centrifugación (15000 g, 2 min). Se añadieron 250 µl de Chelex 100 (Sigma) al 6%, y se incubaron a 56°C durante 30 min mezclando frecuentemente. A continuación los tubos se incubaron en agua hirviendo durante 8 min. Finalmente se centrifugaron a 15000 g durante 2 min, y se tomaron 1.5 µl del sobrenadante para la amplificación por PCR. Se amplificó un fragmento del gen de la luciferasa de 400 pb. Se utilizaron los cebadores LUC3 (5'-TTGCTTTTACAGATGCACATATCGAG-3') y LUC4 (5'-GAGGTAGATGAGATGTGACGAACG-3'). La reacción de PCR se preparó siguiendo procedimientos estándar (Sambrook & Russell 2001). El proceso de amplificación consistió en: un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido de 13 ciclos con una hibridación de 30 s con gradiente de temperatura, siendo la temperatura inicial de 66°C y la temperatura final de 60°C, y 22 ciclos adicionales a una temperatura de hibridación de 60°C. La desnaturalización en cada ciclo, se llevó a cabo a 95°C durante 30 s, y la extensión a 72°C durante 45 s. La amplificación se completó con un paso de extensión final a 72°C durante 10 min. Los fragmentos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

Análisis estadístico

Todos los tratamientos estadísticos se realizaron mediante el procedimiento ANOVA del paquete informático SAS Statistical Package, 1995. Sas Institute Inc. Cary, NC. USA. Para detectar diferencias significativas entre medias se utilizó un análisis de varianza de un factor.

1.1.3.- RESULTADOS

Expresión de genes exógenos en músculo de lubina: respuesta según la dosis y el tiempo

Se inyectaron diferentes cantidades del plásmido pCMVtk-luc+ en músculo de lubina para determinar el comportamiento de este tejido en la toma y subsiguiente expresión de la luciferasa. Para determinar la dosis óptima de plásmido a inyectar, y basándonos en trabajos previos (Anderson *et al.* 1996a; Gomez-Chiarri & Chiaverini 1999), se inyectaron 25, 50, 75 o 100 µg de plásmido. Cuatro días después de la inyección se recogieron muestras del músculo inyectado, se homogeneizaron y se midió la actividad luciferasa.

Todos los peces inyectados mostraron, al menos, veinte veces más actividad luciferasa que los peces sin inyectar. Los niveles obtenidos oscilaron entre 13 pg de luciferasa/µg de proteína a 740 pg de luciferasa/µg de proteína. En promedio, los valores más altos de actividad luciferasa se obtuvieron en peces inyectados con 75 µg de plásmido, aunque las diferencias con otras dosis de plásmido no resultaban significativas (fig 1.1.2A). Por otra parte, se observó una gran variabilidad en los niveles de actividad luciferasa entre los individuos inyectados con una misma dosis.

Para estudiar la expresión de luciferasa a lo largo del tiempo se inyectaron animales con 25 µg del plásmido pCMVtk-luc+. Se tomaron muestras de músculo en diferentes días y se determinó la actividad luciferasa. Ésta empezó a ser detectable 24 horas después de la inyección del plásmido, y el máximo se obtuvo cinco días después de la inyección, a partir de entonces, comenzaba a decaer. Cabe destacar que las muestras de músculo correspondientes a animales sacrificados 11 días después de la inyección, aún presentaban una actividad luciferasa equivalente al 56% del valor máximo obtenido (fig 1.1.2B).

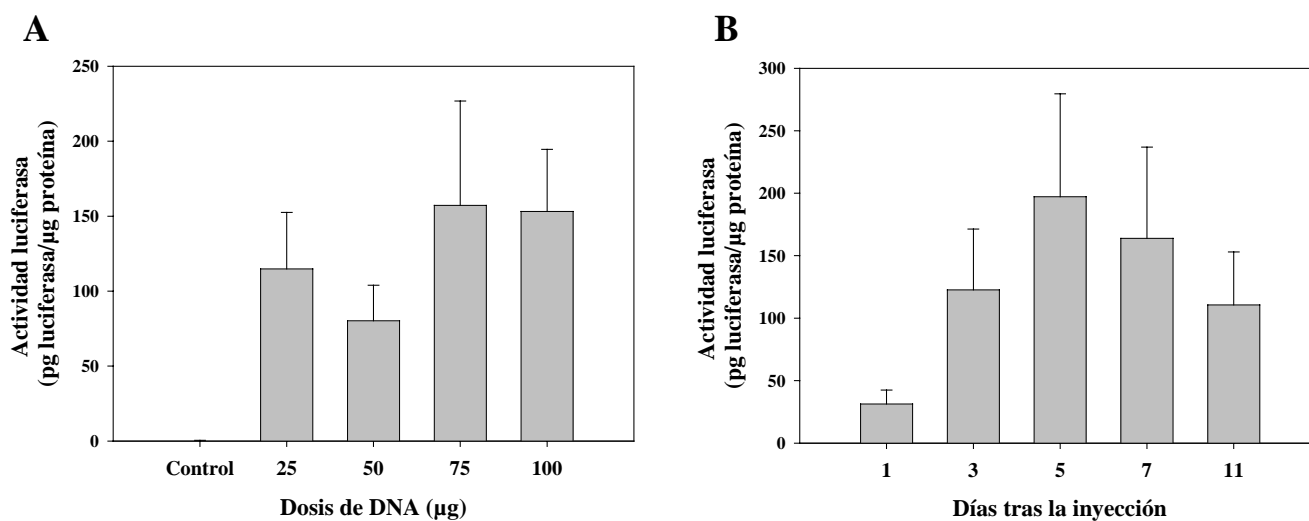


Fig 1.1.2.- (A) Actividad luciferasa obtenida cuatro días después de inyectar distintas dosis del plásmido pCMVtk-luc+ en músculo de lubina. Se inyectaron de 12 a 14 animales por dosis. **(B)** Actividad luciferasa obtenida en diferentes días tras la inyección de 25 μg de pCMVtk-luc+ en músculo de lubina. Los valores de cada día corresponden a 7-8 animales. Las barras representan el error estándar de la media.

Comparación de distintos promotores para dirigir la expresión génica

La secuencia potenciadora del promotor citomegalovirus (CMV), unida al promotor de la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simple, dirige eficazmente la expresión génica en peces, tanto *in vitro* como *in vivo* (Friedenreich & Schartl 1990; Winkler *et al.* 1991; Winkler *et al.* 1992). Tal y como se demuestra en este trabajo, el promotor híbrido CMVtk es también eficiente para dirigir la expresión de genes exógenos en células musculares de lubina. Sin embargo, éste no es un promotor de pez, y su uso no sería conveniente en futuras aplicaciones terapéuticas o biotecnológicas. Hasta el momento no se dispone de ningún promotor de lubina que permita expresar un gen exógeno de manera ubicua, o específicamente en músculo, y que por lo tanto pueda usarse con este propósito. Por este motivo, elegimos el promotor de la actina β de carpa, que ha funcionado eficientemente en otros peces (Gomez-Chiarri & Chiaverini 1999; Hwang *et al.* 2003), para evaluar su utilidad en músculo de lubina. Se

usó un fragmento de 4.6 kb del gen de la actina β de carpa que contenía, además de la región promotora, el primer exón no traducido y el intrón 1 que contiene una secuencia potenciadora (Liu *et al.* 1990; Rahman & Maclean 1992).

Para cuantificar la capacidad relativa de estos dos promotores para dirigir la expresión génica en músculo de lubina, se inyectaron dos grupos diferentes de 10 peces con 25 μ g de los plásmidos pCMVtk-luc⁺ o β -actin-luc⁺. En el punto anterior hemos mencionado que, animales inyectados con dosis iguales de DNA muestran niveles bastante diferentes de expresión del gen. Para poder corregir esta variabilidad todos los peces se coinyectaron con 10 μ g del plásmido pRL-CMV, de manera que la medida de la actividad luciferasa de la Renilla sirviera como control de la eficiencia de las inyecciones. Tras 4 días inyectados, los peces se sacrificaron y se midió la actividad de ambas luciferasas en el músculo. Se encontró que el promotor híbrido CMVtk promovía niveles significativamente más altos de expresión de luciferasa que el promotor de la actina β de carpa, el cual producía una expresión moderada (fig. 1.1.3). Aun así, la actividad luciferasa obtenida en los peces inyectados con β -actin-luc⁺ es dos ordenes de magnitud mayor que la obtenida en peces no inyectados, lo que indica que este promotor se puede utilizar, cuando no sea necesaria una expresión muy alta del gen exógeno.

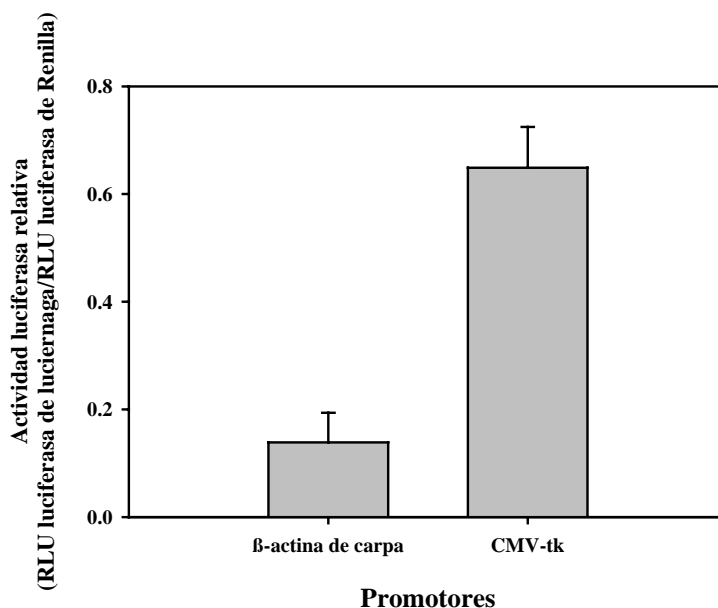


Fig 1.1.3.- Actividad luciferasa relativa en músculo de peces inyectados con 25 µg de pβ-actin-luc+ o pCMVtk-luc+. Existen diferencias significativas (prueba t, $p < 0.05$) entre las actividades obtenidas con estos promotores. Las barras representan la media de 10 muestras con su correspondiente error estándar representado arriba.

Efecto de la temperatura del agua en la eficiencia de la inyección de DNA

La lubina es un teleósteo marino que puede vivir en un rango amplio de temperaturas que varía entre 5°C y 30°C, pero su estado metabólico depende de las condiciones ambientales, como la temperatura y el fotoperíodo. En invierno, su metabolismo se ralentiza, come menos, los procesos de hipertrofia e hiperplasia que gobiernan el crecimiento del músculo se ven afectados, y globalmente su tasa de crecimiento disminuye. Para evaluar la eficiencia de la inyección de DNA en peces en estados metabólicos diferentes, se distribuyeron animales de un mismo origen en dos grupos con agua a diferentes temperaturas, 12°C y 19°C. Se mantuvieron durante diez días a estas temperaturas, y posteriormente se inyectaron con 50 µg del plásmido pCMVtk-luc+. Tras cuatro días se sacrificaron y se midió la actividad luciferasa en

músculo. Los peces mantenidos a 19°C mostraron una media de 25 veces más actividad luciferasa que los peces mantenidos a 12°C. Estos resultados indican que el estado metabólico del músculo es un parámetro importante para conseguir una respuesta óptima a la inyección de DNA en músculo (fig 1.1.4).

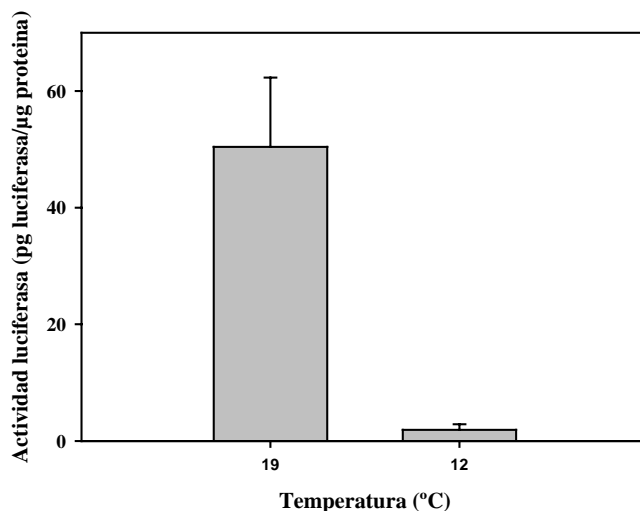


Fig 1.1.4.- Actividad luciferasa en músculo de peces inyectados con 50 µg de pCMVtk-luc+ y mantenidos a dos temperaturas diferentes, 12°C y 19°C. Las barras representan la media de 8 a 12 muestras con su correspondiente error estándar representado arriba. Existen diferencias significativas (prueba t, $p < 0.05$) entre la actividad obtenida a las diferentes temperaturas.

Respuesta del músculo de lubina a inyecciones de DNA con distintas formulaciones

En mamíferos se ha observado que la regeneración inducida del músculo va acompañada de un aumento en la toma de DNA, y por lo tanto en la expresión del gen que se ha transferido. Se ha demostrado que la inyección de tóxicos que causan daño en el músculo, como la bupivacaína o la cardiotoxina, produce una mejora de la toma del DNA por las células musculares. La bupivacaína es un anestésico local que resulta tóxico para las fibras musculares al inyectarlo en músculo esquelético de ratón.

Provoca un incremento de la concentración intracelular de calcio, produciendo una hipercontracción y finalmente necrosis. Otros tipos celulares del músculo esquelético, como las células satélite, no se ven afectados. En ratón, el músculo necrosado es capaz de regenerarse muy rápidamente, y puede observarse la formación de miotúbulos entre 4 y 7 días después del tratamiento con bupivacaína. Este es el momento más óptimo para la inyección de DNA, pues las fibras musculares recién fusionadas lo tomarán eficazmente (Wells 1993; Danko *et al.* 1994).

En este trabajo hemos evaluado esta estrategia para su uso en el músculo de lubina. Como agentes miotóxicos se inyectaron, cardiotoxina o diferentes dosis de bupivacaína. Tres días después se inyectaron 25 µg del plásmido pCMVtk-luc+ (fig. 1.1.5A). Por otra parte se realizó un estudio de respuesta temporal para establecer cual era el momento idóneo para la inyección del DNA tras el tratamiento con bupivacaína; para ello se inyectaron peces con una dosis intermedia de bupivacaína (0.5%), y a continuación algunos de ellos se inyectaron el mismo día con 25 µg de pCMVtk-luc+, y otros 1, 3 o 6 días después de la bupivacaína (fig 1.1.5B). Como se observa en las figuras 1.1.5, la actividad luciferasa obtenida es claramente menor en los animales tratados con miotóxicos, frente a los no tratados. Por lo tanto, el tratamiento con miotóxicos afecta a la respuesta del músculo a la inyección del DNA, probablemente debido a un daño muscular. Sin embargo, parece que no existe regeneración muscular incluso seis días después del tratamiento. Se sabe poco sobre el proceso de regeneración del músculo en peces, aunque en los casos estudiados parece que este proceso es más lento que en el caso de mamíferos (Rowlerson *et al.* 1997). Para comprobar si la regeneración del músculo ocurría más tarde, y ésta era la causa de la baja respuesta al tratamiento con miotóxicos, se inyectaron peces con diferentes concentraciones de bupivacaína y se esperó tres semanas para inyectar 25 µg del plásmido pCMVtk-luc+. Aunque la actividad luciferasa obtenida fue algo mayor que cuando se inyectaba el DNA tras unos pocos días de tratamiento, en ningún caso se superó la actividad obtenida en músculo no tratado (fig. 1.1.5C).

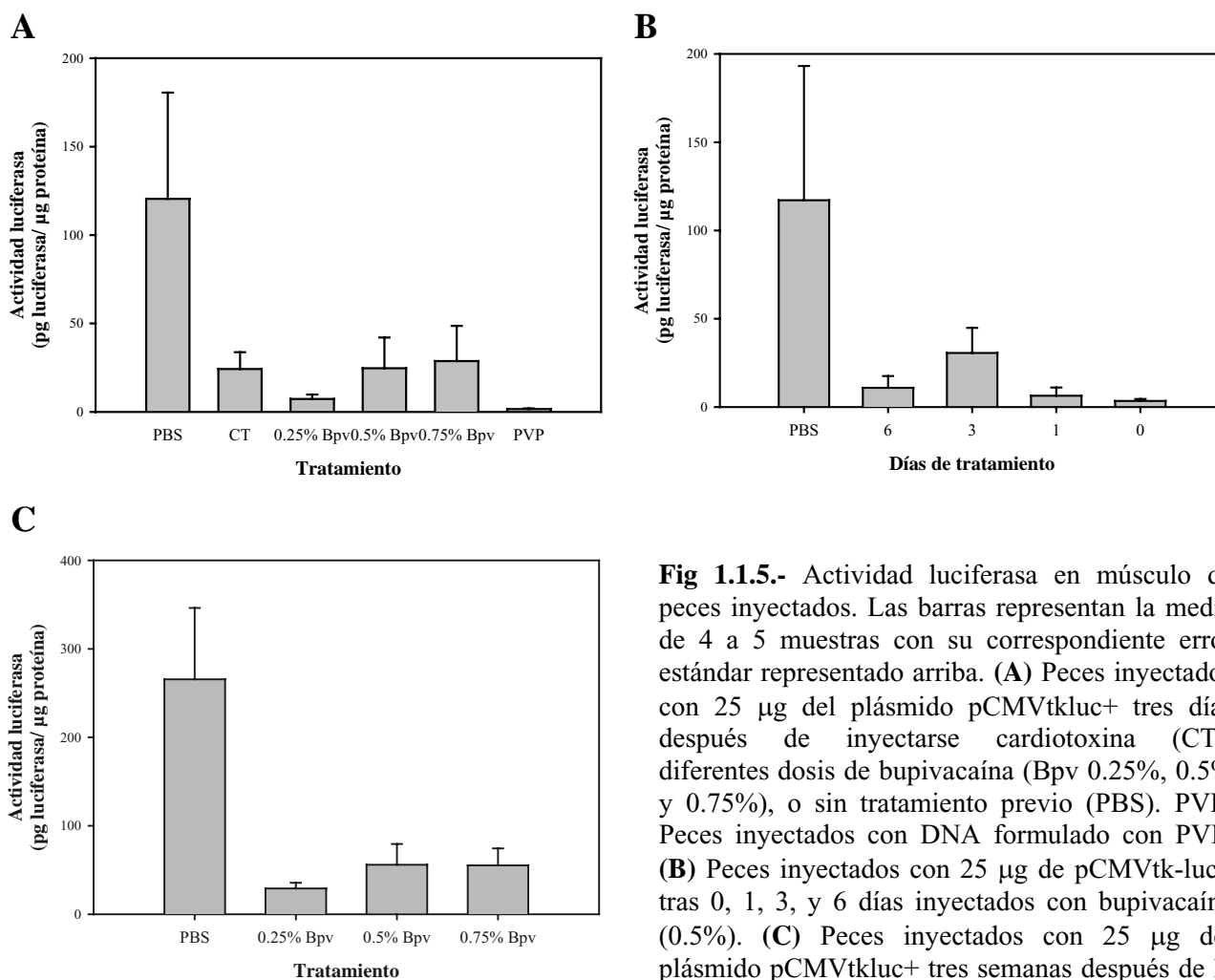


Fig 1.1.5.- Actividad luciferasa en músculo de peces inyectados. Las barras representan la media de 4 a 5 muestras con su correspondiente error estándar representado arriba. **(A)** Peces inyectados con 25 µg del plásmido pCMVtkluc+ tres días después de inyectarse cardiotoxina (CT), diferentes dosis de bupivacaína (Bpv 0.25%, 0.5% y 0.75%), o sin tratamiento previo (PBS). PVP: Peces inyectados con DNA formulado con PVP. **(B)** Peces inyectados con 25 µg de pCMVtk-luc+ tras 0, 1, 3, y 6 días inyectados con bupivacaína (0.5%). **(C)** Peces inyectados con 25 µg del plásmido pCMVtkluc+ tres semanas después de la inyección con diferentes dosis de bupivacaína.

Para entender mejor el efecto del tratamiento con bupivacaína, se llevó a cabo un estudio histológico. Varios peces se inyectaron con bupivacaína al 0.75%. Tres semanas más tarde se inyectaron con el plásmido pCMVtk-lacZ, que contiene el gen de la β -galactosidasa de *E. coli*. Tras revelar la actividad β -galactosidasa en el músculo inyectado (fig 1.1.6), se pudo observar que la mayoría de las células positivas para β -galactosidasa estaban cercanas a la trayectoria de la aguja de inyección, y mostraban diferentes grados de actividad. Debido al tratamiento con bupivacaína muchas células aparecían necrosadas, con pérdida de las estriaciones e infiltración de macrófagos. La actividad β -galactosidasa sólo se observaba en aquellas células no dañadas por la

bupivacaína, y por lo tanto todavía diferenciadas. Estas observaciones explican la poca actividad luciferasa obtenida en aquellos animales tratados con bupivacaína respecto a los controles no tratados, donde un porcentaje mayor de células habrían incorporado el DNA.

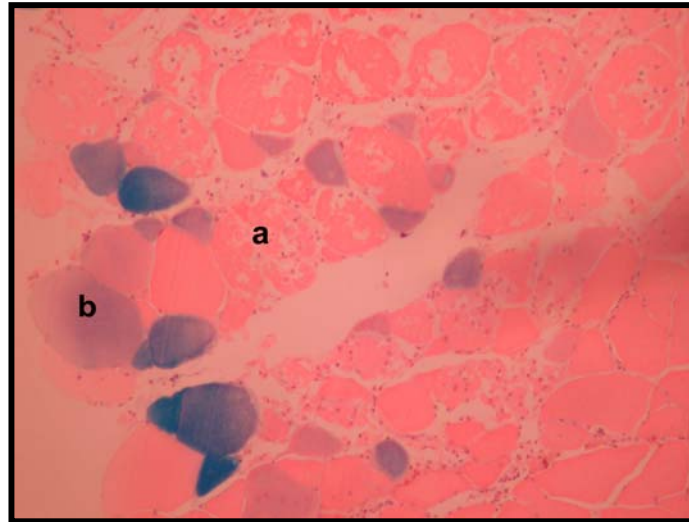


Fig 1.1.6.- Sección transversal de músculo de lubina inyectado con bupivacaína al 0.75% durante 3 semanas y posteriormente con el plásmido pCMVtk-lacZ. Se ha detectado la expresión de la β -galactosidasa, y se ha teñido posteriormente con hematoxilina/eosina. **a** indica una célula en proceso de inflamación/necrosis con pérdida de la integridad celular y las estriaciones. Se observan pequeños núcleos indicativos de infiltración por linfocitos. **b** indica una fibra diferenciada y no dañada expresando la β -galactosidasa.

Con objeto de mejorar la toma de DNA por parte de las células musculares se probó un vehículo diferente al tampón fosfato salino para diluir el DNA. En mamíferos, se ha demostrado que al mezclar el DNA con el polímero polivinilpirrolidona (PVP) se incrementa la toma de éste por parte de las células de manera muy significativa. El complejo formado por el polímero y el DNA es más hidrofóbico que el DNA desnudo. Además, este polímero protege al DNA frente a la

degradación extracelular por nucleasas, dispersando y manteniendo el plásmido intacto en el músculo. Los autores que desarrollaron esta estrategia establecieron las concentraciones óptimas de polímero y NaCl, así como el pH de la mezcla (Mumper *et al.* 1996; Mumper *et al.* 1998). Siguiendo este protocolo, se inyectaron peces con 100 μ l de esta solución conteniendo 25 μ g de pCMVtk-luc+. Los peces control se inyectaron con la misma cantidad de plásmido pero disuelto en PBS.

Contrariamente a lo observado en mamíferos, la actividad luciferasa obtenida en músculo inyectado con el complejo DNA-polímero fue dos órdenes de magnitud menor que la obtenida con el DNA disuelto en PBS (fig. 1.1.5A).

Distribución tisular del DNA inyectado

Para comprobar si el plásmido pCMVtk-luc+ inyectado en músculo se había dispersado a otros tejidos, se amplificaron muestras de DNA extraído de diferentes órganos de animales inyectados, y sacrificados cuatro días después de la inyección. Se procesaron pequeñas porciones de músculo inyectado, branquias, cerebro, corazón, hígado y riñón, y se realizaron reacciones de PCR para detectar la presencia del plásmido pCMVtk-luc+. En todas las muestras de músculo se obtuvo una banda de 400 pb, perteneciente al gen de la luciferasa, pero no hubo amplificación positiva en las muestras de los demás tejidos.

Otra porción de estos tejidos se homogeneizó para medir actividad luciferasa. En consonancia con los resultados de la amplificación de DNA, todas las muestras de músculo, mostraron actividad luciferasa en los niveles esperados. Con las muestras correspondientes a otros tejidos se obtuvieron diferentes resultados. En la mayoría de los peces analizados no se detectó actividad luciferasa en estos tejidos. Solamente cuatro peces mostraron actividad luciferasa, aunque a niveles mucho menores que lo obtenido en el músculo inyectado. Los niveles de actividad luciferasa obtenidos en estos tejidos fueron entre dos y cien veces superiores al nivel basal, que presentaban los animales sin inyectar.

También se tomaron muestras de músculo cerca de la aleta caudal, que es la zona muscular más alejada del sitio de inyección. En todos los casos, se encontró

actividad luciferasa, aunque a un nivel menor que lo alcanzado alrededor del sitio de inyección. Esta actividad fue de tres a cien veces mayor que el nivel basal obtenido en músculo sin inyectar.

1.1.4.- DISCUSIÓN

Con este trabajo hemos establecido las condiciones para una transferencia eficiente de genes en tejido somático de lubina. Esto sirve como base para la vacunación mediante DNA, o la administración de genes que codifiquen proteínas inmunoestimulantes. Es la primera vez que se utiliza esta técnica en lubina, y tras su evaluación en dorada, la segunda vez que se realiza en una especie marina (Verri *et al.* 2003).

Se eligió el músculo esquelético como tejido diana para la introducción de distintos plásmidos que contenían el gen de la luciferasa. La luciferasa permite cuantificar la proteína expresada mediante el ensayo de su actividad enzimática. En todos los peces inyectados, y con todas las dosis probadas, se obtuvieron niveles altos de actividad luciferasa. Sin embargo, a diferencia de otros estudios, no se obtuvo una curva de dosis-respuesta con diferencias significativas; aunque la tendencia era obtener más actividad luciferasa cuanto mayor dosis de plásmido se inyectaba. La falta de diferencias significativas se puede explicar por la gran variabilidad existente entre las muestras de una misma dosis. La existencia de una variabilidad alta entre los individuos inyectados se ha descrito también en ratón (Wolff *et al.* 1990; Wolff *et al.* 1991; Manthorpe *et al.* 1993) y en otros peces (Tan & Chan 1997). Esta variabilidad se debe probablemente a diferencias en la manera exacta en que se realiza la inyección, lo que lleva a que, en los distintos peces, la solución inyectada se distribuya de manera diferente en el músculo. Éste es un factor limitante de la técnica, ya que resulta difícil controlar la eficiencia de cada inyección. Para poder comparar diferentes construcciones de DNA, la introducción de un gen indicador adicional, que sea igual para todas las muestras, ayuda a normalizar la transfección y permite una comparación

fiable, tal y como hemos realizado en este trabajo para la comparación de distintos promotores.

Se ha descrito la posibilidad de que exista una cantidad saturante de DNA, de manera que la utilización de dosis más altas no significa una mayor toma del DNA por parte de las células. En peces de tamaño pequeño, como *Xiphophorus* o pez cebra, cantidades mayores a 20 µg de DNA producen una disminución de la expresión del gen introducido (Tan & Chan 1997) (Schulte *et al.* 1998). En los estudios realizados en carpa, la dosis óptima para inyectar ejemplares de aproximadamente 20 cm de longitud es de 50 µg de DNA. La inyección de cantidades superiores (100 µg) no producía un incremento de la actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) (Hansen *et al.* 1991). En truchas de 50 g de peso como media, se determinó que 50 µg era la dosis óptima de DNA (Gomez-Chiarri *et al.* 1996; Anderson *et al.* 1996a). En el caso de la lubina, hemos observado que 100 µg no es una cantidad saturante, sin embargo, utilizar esta cantidad no muestra un aumento significativo respecto a la expresión obtenida con dosis de 75 µg de DNA. Por lo tanto, la dosis recomendada para una expresión eficiente es de 75 µg para ejemplares de lubina entre 50 y 100 g.

En cuanto a la expresión de luciferasa en los días sucesivos a la inyección, el nivel máximo se obtuvo a los cinco días. Al igual que en otros trabajos en ratón y en peces, la expresión del gen indicador se pudo ya detectar 1 día después de la inyección (Wolff *et al.* 1990; Anderson *et al.* 1996a; Tan & Chan 1997). Se midió actividad luciferasa hasta 11 días después de la inyección, y aunque se obtuvieron niveles menores que a día 5, estas diferencias no eran estadísticamente significativas. Además, hemos observado que todavía se puede detectar actividad luciferasa tres meses después de la inyección (resultados no mostrados).

El nivel de expresión génica obtenido tras la inyección depende, no solo de la cantidad de DNA introducido, si no también del promotor utilizado. En la mayoría de estudios relacionados con la inyección somática de DNA o con vacunas de DNA en peces, se utilizan promotores virales fuertes, normalmente el promotor CMV. El uso de este tipo de promotores es muy útil para trabajos de laboratorio, pues producen niveles altos de expresión génica. Sin embargo, la aprobación de su uso en aplicaciones

biotecnológicas como las vacunas de DNA, es controvertida (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/plasmid.pdf>). Por lo tanto, la evaluación de promotores de origen piscícola es importante para encontrar una alternativa adecuada a los promotores de origen heterólogo. Hasta el momento, no hay disponible ningún promotor propio de lubina que sea funcional de manera ubicua o específica de músculo, y que por lo tanto pueda ser útil para su uso en inyección muscular. En este trabajo se ha evaluado el promotor de la actina β de carpa para dirigir la expresión génica en músculo de lubina. Éste es un promotor de origen piscícola, bien caracterizado y que ha permitido dirigir la expresión de genes exógenos en otras especies de peces (Liu *et al.* 1990; Moav *et al.* 1993; Anderson *et al.* 1996a). En este trabajo hemos ensayado un fragmento de 4.6 kb del gen de la actina β de carpa que contiene, además de la región promotora, el primer exón no traducido y el primer intrón que incluye una secuencia potenciadora. Éste promotor fue menos eficiente que el promotor CMV, pues se obtuvo una expresión seis veces menor que al utilizar el promotor de origen viral. Esto es coherente con las diferencias obtenidas en trucha (Anderson *et al.* 1996a), donde se alcanzó una actividad luciferasa de 14 a 25 veces mayor con el promotor CMV que con el de la actina β de carpa. En otros trabajos, las diferencias de expresión obtenidas con los promotores CMV y actina β de carpa no eran significativas, aunque con el primero se obtenía mayor expresión (Gomez-Chiarri & Chiaverini 1999). Esto puede deberse a que en este último trabajo, se utiliza sólo 1 kb de la región proximal del promotor.

Por otra parte, el primer intrón del gen de la actina β de carpa contiene un elemento potenciador, pero éste no es funcional en todas las especies de peces. Mientras que en pez cebra se ha demostrado su efecto potenciador, éste no se observa en pez rojo (Moav *et al.* 1993) o tilapia (Maclean *et al.* 1992). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que este elemento tampoco es funcional en lubina. Además, ensayos realizados en una línea celular procedente de lubina, también demuestran una eficiencia diez veces menor del promotor de la actina β de carpa frente al promotor CMV (ver cap 3).

Las condiciones fisiológicas del animal pueden influir en la toma del DNA. En lubina, la temperatura y el fotoperiodo influyen en el crecimiento somático. En invierno éste se ve ralentizado, y las mayores tasas de crecimiento se producen en verano. El hecho de que la técnica de la inyección en músculo sea más eficiente en los peces mantenidos en agua templada, refleja que el músculo se encuentra en dos condiciones metabólicamente diferentes según los peces se mantengan a temperaturas más frías o más templadas (Ayala *et al.* 2000; Ayala *et al.* 2001; Ayala *et al.* 2003). Esto es coherente con estudios que han demostrado un efecto de la temperatura sobre el crecimiento de ejemplares juveniles de lubina. A temperaturas de entre 16-20°C el crecimiento muscular era mayor que a 13°C, y este aumento era debido a un incremento en el número de fibras musculares (Nathanailides *et al.* 1996). Por lo tanto, un músculo más activo en cuanto a su crecimiento es más apropiado para la inyección del DNA.

En mamíferos, se ha visto que el uso de bupivacaína (Tokui *et al.* 1997; Ajiki *et al.* 2003), cardiotoxina (Rosato *et al.* 2003), o ciertos polímeros mejora la toma del DNA por parte de las células (Mumper *et al.* 1996; Lemieux *et al.* 2000). Sin embargo, en peces ninguno de estos tratamientos mejoró la eficiencia en la toma del DNA. Tras el tratamiento con bupivacaína, se produce una regeneración inducida en el músculo. En mamíferos, la fusión celular que se produce para formar las nuevas fibras musculares incrementa la toma del DNA por parte de las células. Sin embargo, en músculo de lubina tratado previamente con bupivacaína no se consiguió mejorar la incorporación de DNA. Esto puede deberse a varios factores. Por un lado, se sabe que en algunos peces el número de células satélites es insuficiente para ser la única base celular en la regeneración del músculo; por lo que se postulan mecanismos distintos a mamíferos para el crecimiento muscular (Koumans *et al.* 1991). Por otro lado, puede que la regeneración en peces sea demasiado lenta como para que se produzca un efecto de mejora en la captación de DNA. De hecho, en las observaciones histológicas realizadas en este trabajo no se encuentran signos claros de regeneración, como sería la presencia de células con un solo núcleo central. Solo existe un caso descrito, dónde se usó la regeneración muscular en peces para mejorar la expresión. En ese caso, el

miotóxico aplicado fue BaCl y el nivel de expresión obtenido fue nueve veces inferior al control (Kanellos *et al.* 1999). Tampoco el uso de un polímero para vehicular el DNA ha resultado eficiente frente al uso de PBS. Aunque no se ha encontrado una razón que explique estos resultados, parece claro que este método no es válido en peces.

Para evaluar la dispersión del DNA inyectado en músculo, se realizó un análisis por PCR de muestras de diferentes tejidos de peces inyectados. Se observó que el DNA plasmídico permanecía confinado en el sitio de inyección. En otros casos donde se analizó la presencia del DNA inyectado en otros tejidos, tampoco se obtuvo un resultado positivo (Verri *et al.* 2003; Anderson *et al.* 1996a). Sin embargo, cuando se utilizan peces más pequeños (1-2 g) el DNA es capaz de introducirse y expresarse en otros órganos (Anderson *et al.* 1996b; Heppell *et al.* 1998).

Por otro lado, la detección de actividad luciferasa en células musculares lejos del sitio de inyección, puede indicar que parte de la solución inyectada no es tomada por el músculo, y se extiende por debajo de la piel, siendo captada por fibras musculares más alejadas.

Finalmente, este trabajo demuestra que la inyección intramuscular de DNA en lubina, puede utilizarse como método efectivo de transferencia génica somática. Esta técnica podría usarse, en algunos casos, como alternativa a una transgénesis estable en especies, como la lubina, donde es difícil de desarrollar debido a sus largos tiempos de generación (2-3 años).

Bibliografía

- Ajiki T, Murakami T, Kobayashi Y, Hakamata Y, Wang J, Inoue S, Ohtsuki M, Nakagawa H, Kariya Y, Hoshino Y & Kobayashi E 2003 Long-lasting gene expression by particle-mediated intramuscular transfection modified with bupivacaine: combinatorial gene therapy with IL-12 and IL-18 cDNA against rat sarcoma at a distant site. *Cancer Gene Ther.* **10** 318-329.
- Alam MS, Lavender FL, Iyengar A, Rahman MA, Ayad HH, Lathe R, Morley SD & Maclean N 1996 Comparison of the activity of carp and rat beta-actin gene regulatory sequences in tilapia and rainbow trout embryos. *Mol.Reprod.Dev.* **45** 117-122.
- Altschmied J & Duschl J 1997 Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors. *Biotechniques* **23** 436-438.

- Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J & Leong JA 1996a Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **5** 105-113.
- Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J & Leong JAC 1996b Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **5** 114-122.
- Ayala MD, Lopez-Albors O, Gil F, Latorre R, Vazquez JM, Garcia-Alcazar A, Abellan E, Ramirez G & Moreno F 2000 Temperature Effect on Muscle Growth of the Axial Musculature of the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C* **29** 235-242.
- Ayala M, Lopez Albors O, Garcia Alcazar A, Abellan E, Latorre R, Vazquez JM, Ramirez Zarzosa G, Martinez F & Gil F 2003 Effect of Two Thermal Regimes on the Muscle Growth Dynamics of Sea Bass Larvae, *Dicentrarchus labrax* L. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C* **32** 271-275.
- Ayala MD, Lopez-Albors O, Gil F, Garcia-Alcazar A, Abellan E, Alarcon JA, Alvarez MC, Ramirez-Zarzosa G & Moreno F 2001 Temperature effects on muscle growth in two populations (Atlantic and Mediterranean) of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* **202** 359-370.
- Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P & Benmansour A 1998 Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* **249** 297-306.
- Corbeil S, Kurath G & LaPatra SE 2000a Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. *Fish Shellfish.Immunol.* **10** 711-723.
- Corbeil S, LaPatra SE, Anderson ED & Kurath G 2000b Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vaccine* **18** 2817-2824.
- Danko I, Fritz JD, Jiao SS, Hogan K, Latendresse JS & Wolff JA 1994 Pharmacological Enhancement of In-Vivo Foreign Gene-Expression in Muscle. *Gene Therapy* **1** 114-121.
- Dijkstra JM, Okamoto H, Ototake M & Nakanishi T 2001 Luciferase expression 2 years after DNA injection in glass catfish (*Kryptopterus bicirrhus*). *Fish Shellfish.Immunol.* **11** 199-202.
- Friedenreich H & Scharfl M 1990 Transient expression directed by homologous and heterologous promoter and enhancer sequences in fish cells. *Nucleic Acids Res.* **18** 3299-3305.
- Gomez-Chiarri M & Chiaverini LA 1999 Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture. *Genetic Analysis-Biomolecular Engineering* **15** 121-124.
- Gomez-Chiarri M, Livingston SK, Muro-Cacho C, Sanders S & Levine RP 1996 Introduction of foreign genes into the tissue of live fish by direct injection and particle bombardment. *Diseases of Aquatic Organisms* **27** 5-12.
- Hanahan D 1983 Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166** 557-580.

- Hansen E, Fernandes K, Goldspink G, Butterworth P, Umeda PK & Chang KC 1991 Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Lett.* **290** 73-76.
- Heppell J & Davis HL 2000 Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced Drug Delivery Reviews* **43** 29-43.
- Heppell J, Lorenzen N, Armstrong NK, Wu T, Lorenzen E, Einer-Jensen K, Schorr J & Davis HL 1998 Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. *Fish & Shellfish Immunology* **8** 271-286.
- Hwang GL, Azizur RM, Abdul RS, Sohm F, Farahmand H, Smith A, Brooks C & Maclean N 2003 Isolation and characterisation of tilapia beta-actin promoter and comparison of its activity with carp beta-actin promoter. *Biochim.Biophys.Acta* **1625** 11-18.
- Kanellos T, Sylvester ID, Howard CR & Russell PH 1999 DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish. *Vaccine* **17** 965-972.
- Koumans JT, Akster HA, Booms GH, Lemmens CJ & Osse JW 1991 Numbers of myosatellite cells in white axial muscle of growing fish: *Cyprinus carpio* L. (Teleostei). *Am.J.Anat.* **192** 418-424.
- Lemieux P, Guerin N, Paradis G, Proulx R, Chistyakova L, Kabanov A & Alakhov V 2000 A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy* **7** 986-991.
- Liu ZJ, Moav B, Faras AJ, Guise KS, Kapuscinski AR & Hackett PB 1990 Functional analysis of elements affecting expression of the beta-actin gene of carp. *Mol.Cell Biol.* **10** 3432-3440.
- Lorenzen N, Cupit PM, Einer-Jensen K, Lorenzen E, Ahrens P, Secombes CJ & Cunningham C 2000 Immunoprophylaxis in fish by injection of mouse antibody genes. *Nat.Biotechnol.* **18** 1177-1180.
- Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, Heppell J, Wu T & Davis H 1998 Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* **8** 261-270.
- Maclean N, Iyengar A, Rahman A, Sulaiman Z & Penman D 1992 Transgene transmission and expression in rainbow trout and tilapia. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 355-365.
- Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M & Dwarki V 1993 Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum.Gene Ther.* **4** 419-431.
- Mikalsen AB, Torgersen J, Alestrom P, Hellemann AL, Koppang EO & Rimstad E 2004 Protection of atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Dis.Aquat.Organ* **60** 11-20.
- Moav B, Liu Z, Caldovic LD, Gross ML, Faras AJ & Hackett PB 1993 Regulation of expression of transgenes in developing fish. *Transgenic Res.* **2** 153-161.
- Mumper RJ, Duguid JG, Anwer K, Barron MK, Nitta H & Rolland AP 1996 Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm.Res.* **13** 701-709.

- Mumper RJ, Wang JJ, Klakamp SL, Nitta H, Anwer K, Tagliaferri F & Rolland AP 1998 Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle. *Journal of Controlled Release* **52** 191-203.
- Nathanailides C, Lopez-Albors O, Abellan E, Vazquez JM, Tyler DD, Rowlerson A & Stickland NC 1996 Muscle cellularity in relation to somatic growth in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Aquaculture Research* **27** 885-889.
- Rahman A & Maclean N 1992 Fish transgene expression by direct injection into fish muscle. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 286-289.
- Raz E, Watanabe A, Baird SM, Eisenberg RA, Parr TB, Lotz M, Kipps TJ & Carson DA 1993 Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **90** 4523-4527.
- Rosato A, Zoso A, Milan G, Macino B, Dalla SS, Tosello V, Di Carlo E, Musiani P, Whalen RG & Zanovello P 2003 Individual analysis of mice vaccinated against a weakly immunogenic self tumor-specific antigen reveals a correlation between CD8 T cell response and antitumor efficacy. *J.Immunol.* **171** 5172-5179.
- Rowlerson A, Radaelli G, Mascarello F & Veggetti A 1997 Regeneration of skeletal muscle in two teleost fish: *Sparus aurata* and *Brachydanio rerio*. *Cell and Tissue Research* **289** 311-322.
- Sambrook J & Russell DW 2001 *Molecular cloning. A laboratory manual*.
- Schulte PM, Gomez-Chiarri M & Powers DA 1997 Structural and functional differences in the promoter and 5' flanking region of Ldh-B within and between populations of the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Genetics* **145** 759-769.
- Schulte PM, Powers DA & Scharl M 1998 Efficient gene transfer into *Xiphophorus* muscle and melanoma by injection of supercoiled plasmid DNA. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **7** 241-247.
- Tan JH & Chan WK 1997 Efficient gene transfer into zebrafish skeletal muscle by intramuscular injection of plasmid DNA. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **6** 98-109.
- Tokui M, Takei I, Tashiro F, Shimada A, Kasuga A, Ishii M, Ishii T, Takatsu K, Saruta T & Miyazaki J 1997 Intramuscular injection of expression plasmid DNA is an effective means of long-term systemic delivery of interleukin-5. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **233** 527-531.
- Tripathy SK, Svensson EC, Black HB, Goldwasser E, Margalith M, Hobart PM & Leiden JM 1996 Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **93** 10876-10880.
- Verri T, Ingrosso L, Chiloiro R, Danieli A, Zonno V, Alifano P, Romano N, Scapigliati G, Vilella S & Storelli C 2003 Assessment of DNA vaccine potential for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by intramuscular injection of a reporter gene. *Fish Shellfish.Immunol.* **15** 283-295.
- Wells DJ 1993 Improved Gene-Transfer by Direct Plasmid Injection Associated with Regeneration in Mouse Skeletal-Muscle. *Febs Letters* **332** 179-182.
- Winkler C, Hong Y, Wittbrodt J & Scharl M 1992 Analysis of heterologous and homologous promoters and enhancers in vitro and in vivo by gene transfer into Japanese medaka (*Oryzias latipes*) *Xiphophorus*. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 326-337.

- Winkler C, Vielkind JR & Scharl M 1991 Transient expression of foreign DNA during embryonic and larval development of the medaka fish (*Oryzias latipes*). *Mol.Gen.Genet.* **226** 129-140.
- Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P & Jani A 1992 Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum.Mol.Genet.* **1** 363-369.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A & Felgner PL 1990 Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247** 1465-1468.
- Wolff JA, Williams P, Acsadi G, Jiao S, Jani A & Chong W 1991 Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques* **11** 474-485.

**1.2.- DISEÑO DE UNA GONADOTROFINA DE
CADENA ÚNICA. DETECCIÓN EN SANGRE
TRAS INYECTAR SU SECUENCIA
CODIFICANTE EN MÚSCULO DE LUBINA**

1.2.1.- INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de genes aislados de distintas especies de peces ha permitido obtener proteínas recombinantes utilizando diferentes sistemas de expresión, como *Escherichia coli* (Martinez-Barbera *et al.* 1994; Solomon & Appels 1999; Chang *et al.* 2002), levadura (Loewen *et al.* 1997; Kamei *et al.* 2003; Kasuto & Levavi-Sivan 2005), y células de insecto y de mamífero (Li *et al.* 1997; Minagawa *et al.* 2001). La generación de proteínas recombinantes tiene objetivos muy diversos, y entre sus aplicaciones destacan, la realización de estudios bioquímicos o estructurales de la proteína, su utilización como antígenos para inmunización, y su uso biotecnológico o terapéutico mediante la administración *in vivo* a un organismo diana. En todos estos casos se requiere la purificación de la proteína recombinante, por lo que dos de los requisitos de los sistemas de expresión son, niveles altos de producción de la proteína y facilidad de purificación. Además, las proteínas recombinantes deben procesarse y modificarse correctamente para asegurar su funcionalidad. Para asegurar este último punto, debe elegirse un sistema de expresión que posea la maquinaria apropiada para producir las modificaciones postraduccionales necesarias (Okuno *et al.* 2002). Por otra parte, pueden aparecer dificultades añadidas, como son los problemas de disociación en caso de proteínas multiméricas (Muyan *et al.* 1998).

A pesar de la existencia de sistemas diversos de expresión, tanto procariotas como eucariotas, la producción y purificación de proteínas recombinantes de peces se ha mantenido muy limitada, si la comparamos con la gran cantidad de genes de origen piscícola que se han aislado en los últimos años. Esto se debe en muchos casos a la complejidad de la proteína a producir, pues suele requerirse un trabajo a largo plazo en el que pueden surgir complicaciones. La falta de disponibilidad de estas proteínas recombinantes limita la realización de estudios básicos sobre su función, e incluso el abordaje de aplicaciones biotecnológicas. Para realizar estudios *in vivo* existe una alternativa a la administración de proteínas recombinantes. Ésta consiste en la

introducción de su gen codificante en células somáticas del organismo, para que éstas expresen el gen y produzcan la proteína.

En el subcapítulo 1.1, se han descrito las condiciones óptimas para la transferencia génica somática en músculo de lubina. También se ha comprobado que esta técnica es eficiente para la introducción de genes en células musculares, donde posteriormente se produce la síntesis de la proteína correspondiente. En el presente subcapítulo, se ha querido evaluar este sistema como método para suministrar proteínas al torrente sanguíneo en peces. Para ello, los genes inyectados deben codificar proteínas secretables, con la secuencia señal correspondiente que permita su secreción. Nosotros elegimos una hormona gonadotropa, la hormona luteinizante (LH) de lubina.

Las hormonas gonadotropas (GTHs) juegan un papel crítico como reguladoras de la gametogénesis y esteroidogénesis en los vertebrados, incluidos los teleósteos. En muchas especies de teleósteos se ha demostrado la existencia de dos tipos de GTHs, homólogas a la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) de mamíferos. De manera similar a lo que ocurre en mamíferos, los estudios fisiológicos realizados en salmónidos indican que la FSH está involucrada en el control de la gametogénesis, y la LH regula principalmente el final de la maduración gonadal y la puesta (Schulz *et al.* 2001). Estas dos hormonas se producen en la hipófisis. Una tercera hormona perteneciente a esta familia de glicoproteínas es la gonadotrofina coriónica (CG), exclusiva de humanos y equinos, y producida por la placenta.

La FSH y la LH son heterodímeros formados por dos subunidades, una subunidad alfa (α) común para ambas hormonas, y una subunidad beta (β) que es específica de cada hormona. Cada una de estas subunidades está codificada por un gen diferente (Pierce & Parsons 1981). Las subunidades α y β se asocian de forma no covalente para constituir la hormona en su forma activa (Combarous 1992). La conformación de este heterodímero es esencial para que se produzcan la secreción y la glicosilación de la hormona (Muyan *et al.* 1998; Ben Menahem 2004). Las subunidades α y β de la gonadotrofina coriónica humana (hCG) se secretan de manera eficiente como monómeros; sin embargo, las demás subunidades β específicas producidas por la hipófisis quedan retenidas en el retículo endoplasmático y solo se

secretan de forma eficiente tras su dimerización con la subunidad α . Por otro lado, puede producirse la disociación de las subunidades una vez secretadas, con lo que la hormona deja de ser activa (Muyan *et al.* 1998). De hecho, la producción de hormonas gonadotropas recombinantes (LH y FSH), tanto de mamíferos como de peces, en sistemas de expresión heterólogos es escasa (Kasuto & Levavi-Sivan 2005).

La expresión de los genes que codifican ambas subunidades como un único gen de fusión, permite la obtención de GTHs monoméricas evitando problemas de disociación. En mamíferos, se han construido gonadotrofinas recombinantes de cadena única mediante la fusión del gen de la subunidad común α y el gen de la subunidad β específica de cada hormona (Garcia-Campayo *et al.* 1997; Ben Menahem *et al.* 1997; Fares *et al.* 1998; Ben Menahem *et al.* 1999; Kumar *et al.* 1999). Una consideración importante en esta fusión es el espacio que debe existir entre las subunidades α y β , para que éstas puedan adoptar su configuración funcional. En la construcción de GTHs humanas de cadena única se ha utilizado un espaciador entre las subunidades. Éste ha consistido en un fragmento de aproximadamente 90 nucleótidos que codifica el extremo carboxi-terminal de la subunidad β de la CG humana (hCG). Este fragmento, que solo existe en la hCG, se denomina péptido carboxiterminal (CTP), y su composición de aminoácidos le aporta ciertas características que lo hacen apropiado como espaciador. Posee poca estructura secundaria, es flexible e hidrofílico, no participa en la unión al receptor, y está muy glicosilado, lo que ayuda a aumentar su vida media (Sugahara *et al.* 1996). Estas construcciones basadas en una cadena única aseguran la unión permanente de las subunidades, imprescindible para su secreción y actividad biológica, y permiten una mayor estabilidad y vida media de las moléculas respecto a su conformación natural (Garcia-Campayo & Boime 2001). Además, una vez eliminados los problemas de disociación, estas hormonas recombinantes pueden servir de base para el diseño y construcción de análogos más potentes o antagonistas. Éstos son útiles en estudios de funcionalidad y también pueden tener aplicaciones terapéuticas (Ben Menahem 2004).

Los genes que codifican las subunidades de la LH y la FSH se han aislado en varias especies de peces, incluida la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Mateos *et al.* 2003),

lo que hace posible la construcción de una LH y una FSH de cadena única para esta especie.

En este trabajo, pretendemos evaluar la transferencia génica somática como método *in vivo* para liberar al torrente sanguíneo los productos de los genes introducidos. Para ello, hemos construido una hormona LH de cadena única (LHsc, *single chain*), mediante la fusión, a través del péptido CTP, de los genes que codifican las cadenas α y β de la LH de la lubina. Tras la inyección intramuscular de este gen de fusión (ver 1.1), hemos comprobado que la LHsc se expresa en las células musculares y posteriormente se secreta al torrente sanguíneo. Utilizando el mismo ensayo inmunológico (ELISA) establecido para la detección de la LH nativa, hemos sido capaces de detectar la LH recombinante en sangre.

1.2.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Construcciones de DNA

pCMV-LHsc. Este plásmido contiene la LHsc de lubina. Se construyó mediante la fusión de los cDNAs que codifican las subunidades α y β , usando PCR solapante (Horton *et al.* 1989; Ho *et al.* 1989). Para unir las se utilizó el péptido carboxiterminal (CTP) de la hCG (fig 1.2.1).

Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

- 1 5'-CCGGGGATCCCCAGAGAGGATGATGGCTGTG-3'
- 2 5'-TGAGGAAGAGGAGTAGTAGAAAGGTATGTC-3'
- 3 5'-CCTTTCTACTACTCCTCTTCCTCAAAGGCC-3'
- 4 5'-CATGCTGGGGTATTGTGGGAGGATCGG-3'
- 5 5'-ATCCTCCCACAATACCCAGCATGGACTTA-3'
- 6 5'-CGGAATTCCATGAAAGTGCAACATCTG-3'

Para la construcción de la LHsc, se utilizaron como moldes:

- El cDNA codificante de la subunidad β de la hormona LH de lubina (Mateos *et al.* 2003).
- El cDNA codificante de la subunidad α de la hormona LH de lubina (Mateos *et al.* 2003).
- El cDNA de la subunidad β de la hCG humana que contiene el péptido CTP (28 aa), donado por el Dr. Boime de la Escuela Universitaria de Medicina de Washington, St. Louis (USA).

En la primera reacción de PCR se utilizó el cDNA de la subunidad β de la LH de lubina y los cebadores 1 y 2. El cebador 1 contiene el extremo 5' de la subunidad β de la LH y un sitio *Bam*HI añadido. El cebador 2 contiene los cuatro primeros codones del péptido CTP y parte del extremo 3' de la subunidad β de la LH. Se generó un fragmento que contenía el cDNA de la subunidad β de la LH de lubina con un nuevo sitio *Bam*HI en su extremo 5', y los cuatro primeros codones del péptido CTP en la parte final 3'.

En la segunda reacción, se utilizó el cDNA de la subunidad β de la hCG como molde, y los cebadores 3 y 4. El cebador 3 contiene el extremo 5' del péptido CTP y los cuatro codones finales de la subunidad β de la LH. El cebador 4 contiene los cuatro primeros codones de la subunidad α , y parte del extremo final del péptido CTP. Se generó un fragmento conteniendo el péptido CTP con los cuatro últimos codones de la subunidad β de la LH añadidos en su extremo 5', y los cuatro primeros codones de la subunidad α añadidos en el extremo 3'.

En la tercera reacción se utilizaron los fragmentos resultantes de las reacciones primera y segunda como molde, y los cebadores 1 y 4 para generar un fragmento de fusión que contuviese la subunidad β de la LH, el CTP y los primeros cuatro codones de la subunidad α .

En la cuarta reacción se utilizó la subunidad α de lubina como molde, y los cebadores 5 y 6. El cebador 5 contiene los cuatro primeros codones de la subunidad α de la LH y parte del extremo final del péptido CTP. El cebador 6 contiene el extremo 3' de la subunidad α de la LH y un sitio *Eco*RI añadido. Se generó un fragmento que contenía

la subunidad α de lubina con un nuevo sitio *EcoRI* en su final 3' y los cuatro últimos codones del péptido CTP en el extremo 5'.

En la quinta reacción se utilizaron los fragmentos resultantes de las reacciones tercera y cuarta, y los cebadores 1 y 6, para generar un fragmento de fusión que contuviese la subunidad β de la LH, el péptido CTP y la subunidad α , flanqueado por sitios *BamHI* y *EcoRI*.

El proceso de amplificación se realizó utilizando el siguiente programa: un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos adicionales a una temperatura de hibridación de 50°C durante 30 s. La desnaturalización en cada ciclo, se llevó a cabo a 95°C durante 30 s, y la extensión a 72°C durante 45 s. La amplificación se completó con un paso de extensión final a 72°C durante 5 min. Se utilizó polimerasa de alta fidelidad *Pfu* (Stratagene) en todas las reacciones. El fragmento de fusión finalmente generado se secuenció para comprobar que toda su secuencia coincidía con las originales. El gen híbrido resultante se introdujo en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen) como un fragmento *BamHI-EcoRI*, y el plásmido resultante se llamó **pCMV-LHsc**.

pCMVtk-LacZ, plásmido que expresa constitutivamente el gen de la β -galactosidasa de *Escherichia coli*.

Obtención de DNA plasmídico

Para la propagación de los diferentes plásmidos se transformó *E. coli* DH5 α siguiendo el método de Hanahan (Hanahan 1983). El DNA plasmídico se purificó utilizando cromatografía de intercambio aniónico (Qiagen Inc. Chatsworth, Calif).

Cultivo celular y transfecciones

Las células COS7, procedentes de riñón de mono, se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) con un 10% de suero bovino fetal, L-glutamina (2mM), penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100 unidades/ml), y anfotericina B (0.25 μ g/ml). Las condiciones de incubación fueron de 37° C, 95% de humedad

relativa y 5% de CO₂. Las transfecciones se realizaron con 3µl de FuGENE (Roche) y 1 µg de DNA por pocillo de placa de 6 pocillos. Las células se recogieron 48 horas después de la transfección, tras dos lavados con PBS. Se conservaron a -80°C hasta la extracción de su RNA.

Extracción de RNA y reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR)

Para la extracción del RNA total de las células se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa del RNA obtenido para comprobar su integridad. El RNA extraído se trató con DNAsa (Stratagene) para eliminar cualquier resto de DNA.

Para la reacción de RT se tomaron 5µg de este RNA, y se transcribieron a cDNA durante 50 min a una temperatura de 42°C, utilizando una mezcla aleatoria de hexámeros como cebador. Como transcriptasa reversa se utilizó Superscript II (Invitrogen). Una décima parte de esta reacción se amplificó por PCR utilizando los cebadores 5 y 6.

Inyección de DNA

Se usaron ejemplares jóvenes de lubina (*Dicentrarchus labrax*) para todos los experimentos, y se marcaron con *pit-tag* (*passively integrated transponder*) para poder reconocerlos individualmente. Los peces se mantuvieron en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (17-20°C). Antes de la inyección se anestesiaron por inmersión en 0.02% 2 - phenoxietanol (Sigma). 100 µg de DNA diluidos en 100 µl de tampón fosfato salino (PBS) se inyectaron en el músculo a una profundidad de 0.6 cm, en la parte rostro-ventral bajo la aleta dorsal. Para la inyección, se utilizó una jeringa hipodérmica de insulina y una aguja 26 ½ G. En los días siguientes al experimento se extrajeron muestras de sangre de cada animal. La sangre heparinizada se centrifugó a 960 g durante 20 min para separar el plasma, éste se alicuotó y se mantuvo a -20°C hasta su análisis.

Inmunoensayo para LH de lubina

Los niveles de LH en plasma se midieron mediante la técnica de ELISA (Mateos *et al.* 2005). Las muestras diluidas 1:5 en tampón PBST (10mM PBS, pH 7.2, 0.9% NaCl y 0.05% de Tween-20) con 2% de suero preinmune de cabra (Sigma), se incubaron toda la noche a 4°C en presencia de un anticuerpo policlonal anti-LH de lubina. Este anticuerpo se utilizó diluido 1:80.000. Cada pocillo de una placa de 96 se cubrió con 100 µl de una solución de subunidad β de LH nativa de lubina (10 ng/ml) y se incubó durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, se eliminó esta solución, se lavaron los pocillos con tampón PBST, y se añadió una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 2%. Esta se incubó a 37°C durante 30 minutos para bloquear sitios de unión inespecíficos. Tras un segundo lavado, se añadieron en los pocillos las muestras preincubadas toda la noche con el anticuerpo primario. La placa se incubó entonces a 37°C durante 90 minutos de manera que pudiera unirse, a la LH fijada en la placa, el anticuerpo primario que no se hubiese unido a las muestras. Tras esta incubación se realizó un tercer lavado, se añadió a los pocillos una solución conteniendo un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a una peroxidasa de remolacha (GAR-HRP, Sigma). La placa se incubó con este anticuerpo secundario a 37°C durante 45 min, se lavó para eliminar el anticuerpo no unido y finalmente, se añadió TMB (Biorad) como sustrato de la peroxidasa; se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se paró la reacción con ácido sulfúrico 1N. Tras 5 min, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Mod 3350, Biorad). En todas las placas se utilizó una curva estándar realizada a partir de cantidades conocidas de la subunidad β de la LH de lubina.

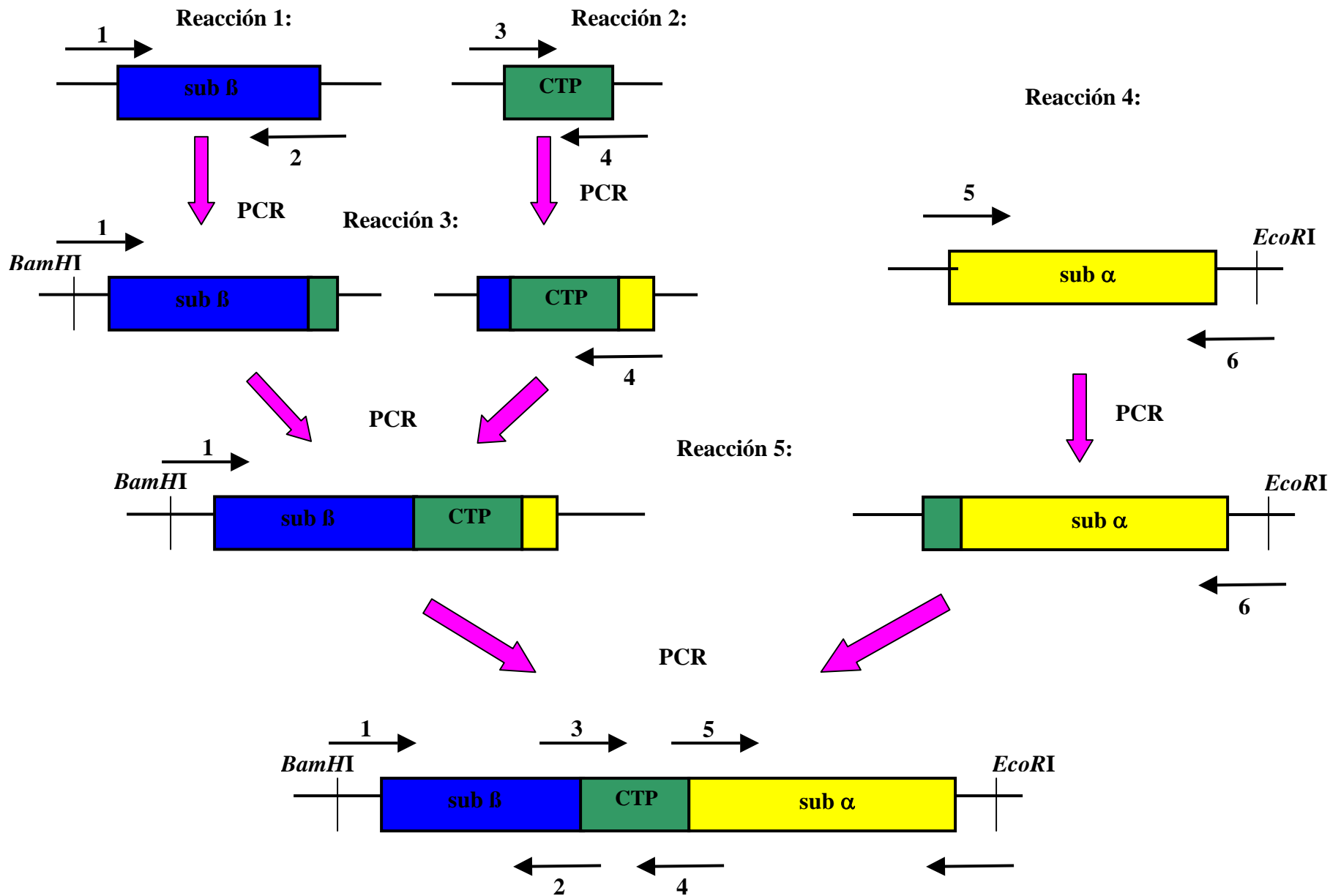


Fig.1.2.1.- Construcción de la LH de cadena única de lubina mediante la fusión de los cDNAs que codifican las subunidades α y β usando PCR solapante

1.2.3.- RESULTADOS

Construcción y expresión *in vitro* del plásmido pCMV-LHsc.

Para evitar problemas de disociación de las subunidades, se construyó un gen híbrido que contiene la fusión de los cDNAs que codifican las dos subunidades de la LH de lubina; obteniéndose así, en una única proteína, ambas subunidades. El cDNA de la subunidad β de la LH se situó en el extremo 5' del gen de fusión, y el cDNA de la subunidad α en el extremo 3'. Estas secuencias se unieron a través del péptido CTP. Se ha demostrado que la presencia del CTP es importante para que el heterodímero adquiriera una conformación correcta y pueda ser secretado (Sugahara *et al.* 1996). El orden de las secuencias fue el descrito porque la parte amino-terminal de la subunidad β de la LH y el extremo carboxiterminal de la subunidad α deben quedar libres, ya que son fundamentales en la unión con el receptor (Ben Menahem *et al.* 2001). Una vez generado el gen de fusión que codificaba para una LHsc de lubina se introdujo en un vector de expresión para células eucariotas, y se comprobó que la construcción realizada era funcional. Se realizaron transfecciones transitorias de células COS7 con objeto de ver que éstas eran capaces de expresar LHsc. A partir del RNA obtenido de estas células se obtuvo el cDNA, posteriormente se emplearon dos cebadores específicos que permitieron amplificar la secuencia correspondiente a la subunidad α de LHsc (fig 1.2.2). Para comprobar que la amplificación no se debía a restos del plásmido pCMV-LHsc presentes en el RNA, se realizó la misma amplificación utilizando directamente RNA como molde. Ésta resultó negativa. Una vez comprobado que la construcción era capaz de expresar el gen de fusión se pasó a realizar ensayos *in vivo*.

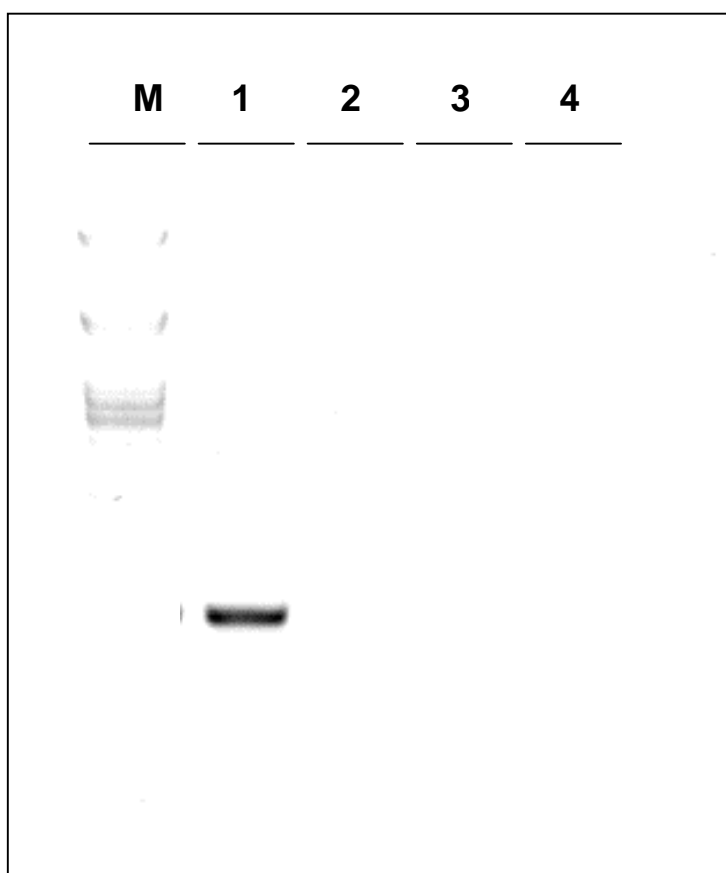


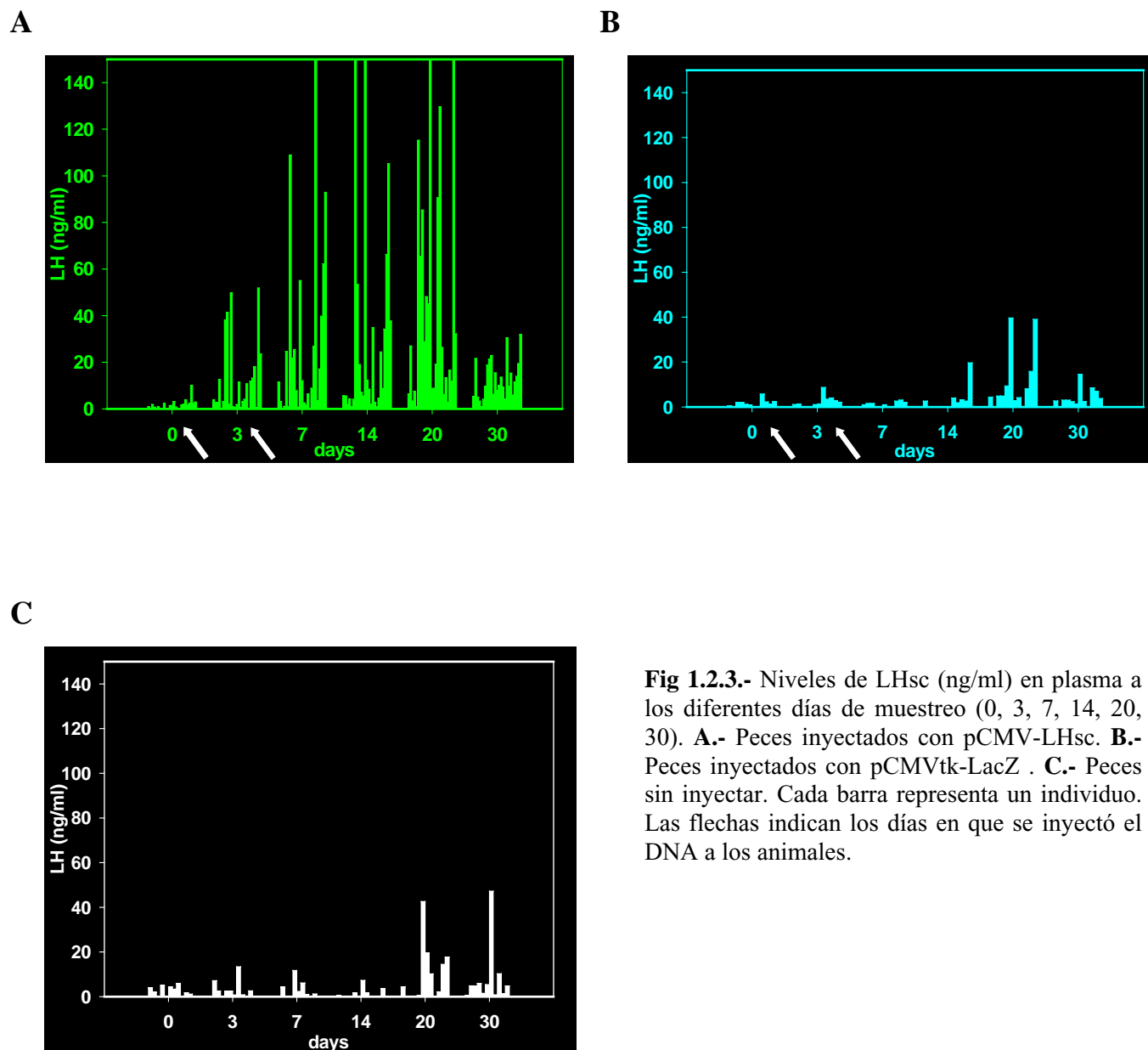
Fig 1.2.2.- Electroforesis de DNA en gel de agarosa **M**: marcador de DNA. Productos de PCR obtenidos con los cebadores 5 y 6. Los moldes usados fueron, **1**: cDNA de células transfectadas con pCMV-LHsc. **2 y 3**: RNA de células transfectadas con pCMV-LHsc tratado con DNAsa. **4**: control negativo

Inyección muscular de pCMV-LHsc y secreción de su producto génico.

Se distribuyeron al azar tres grupos de peces del mismo origen. El control 1, correspondiente a peces no inyectados (n=13). El control 2, correspondiente a peces inyectados (n=12) con 100 μ g de pCMVtk-LacZ. El grupo experimental (n=25), que se inyectó con 100 μ g de pCMV-LHsc por pez. Se realizaron dos inyecciones de DNA, tanto en los peces del control 2 como en el grupo experimental, la primera el día que comenzó el experimento, que denominamos día 0, y la segunda tres días después (día 3). Se tomaron muestras de sangre de todos los peces a día 0, antes de la inyección, y los días 3, 7, 14, 20 y 30 tras la inyección. Se determinó la concentración de LH en cada muestra de

plasma mediante un ELISA específico para LH de lubina. Los resultados muestran que los niveles de LH en muchos de los peces inyectados con pCMV-LHsc incrementaban considerablemente tras la inyección, mientras los niveles de LH en los peces de los grupos control apenas variaban (fig 1.2.3), indicando que el gen introducido se expresaba y además la proteína sintetizada se secretaba al torrente sanguíneo. Entre los individuos del grupo experimental, se observa una gran variabilidad en los niveles de LH obtenidos como respuesta a la inyección de pCMV-LHsc. Como ya se ha discutido en el subcapítulo 1.1, este es un problema intrínseco al uso de la técnica de la inyección de DNA en músculo. Así, los peces se agruparon en cinco niveles distintos en función de la cantidad de LH encontrada en sangre. En aproximadamente un 30% de los animales experimentales se obtuvo un aumento de LH en sangre en torno a uno o dos órdenes de magnitud respecto a los valores medios obtenidos en los grupos control. En estos grupos control alrededor del 60% de los peces mostraron valores de LH en sangre inferiores a 10 ng/ml, mientras que solo uno de los 25 peces inyectados con pCMV-LHsc presentaba estos niveles. La figura 1.2.4, resume los resultados obtenidos en términos de porcentajes; siendo evidente que entre los peces inyectados con pCMV-LHsc están más representados los niveles mayores de LH en sangre.

En la figura 1.2.5 puede observarse que, a pesar de la variabilidad, los máximos niveles de LH en sangre en los peces inyectados se obtuvieron los días 7, 14 y 20. En cualquier caso, observamos que cada pez seguía un perfil propio de respuesta (fig 1.2.6). Además de diferencias en la cantidad máxima de LH detectada, también se observa que la persistencia de la LH en sangre con el tiempo varía entre los distintos individuos.



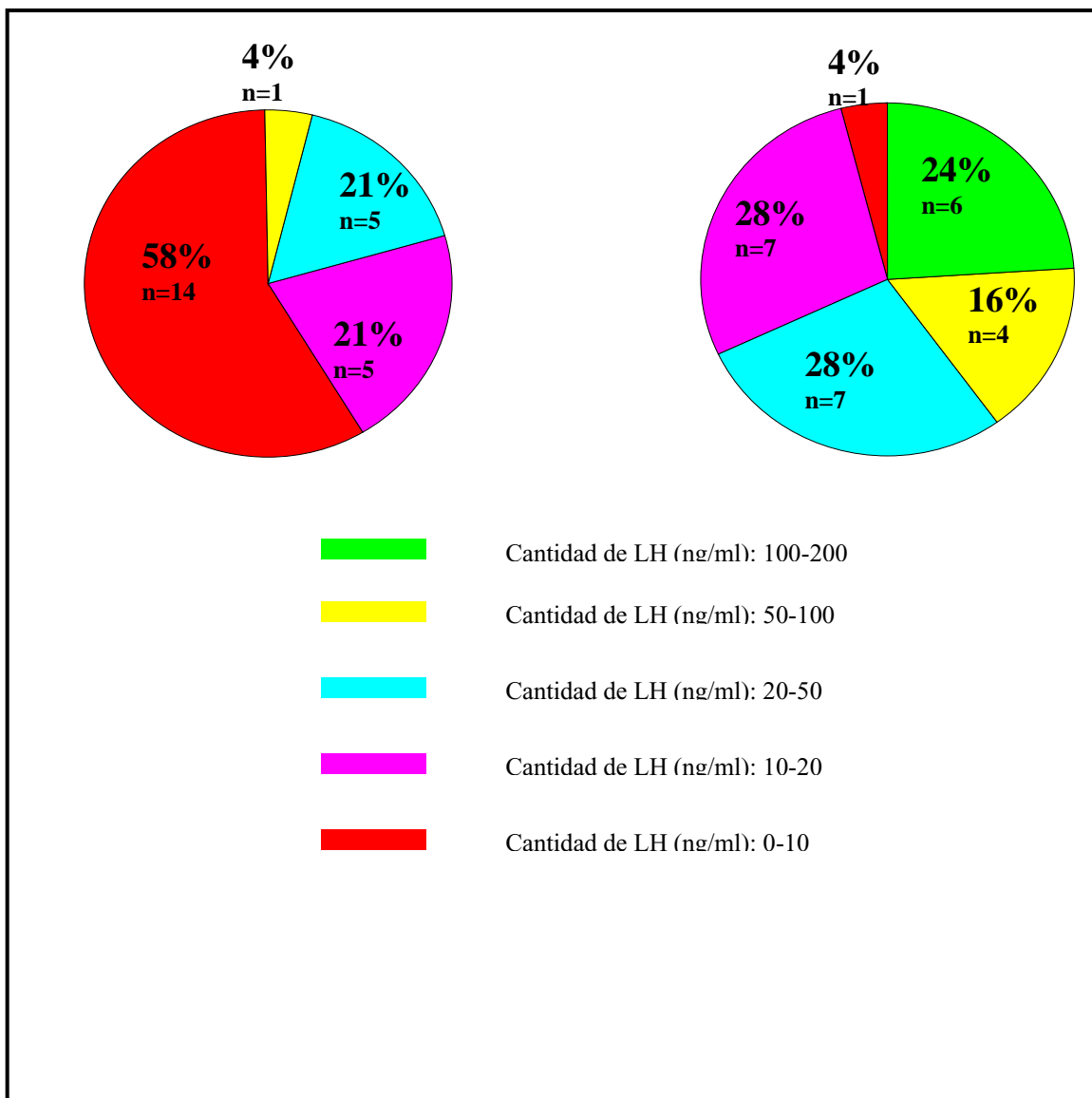
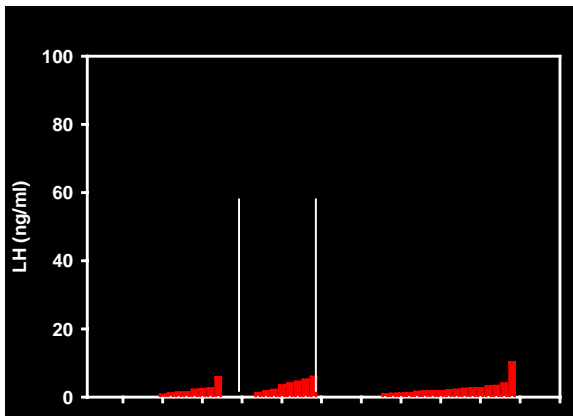
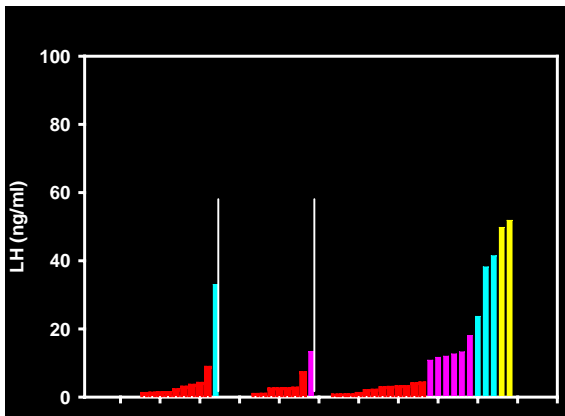


Fig 1.2.4.- Porcentaje de peces en función del nivel máximo de LH (ng/ml) alcanzado a lo largo de todos los días que duró el experimento. El gráfico de la izquierda agrupa a los peces inyectados con pCMVtk-LacZ y a los peces sin inyectar (grupos control). El gráfico de la derecha representa los peces inyectados con pCMV-LHsc

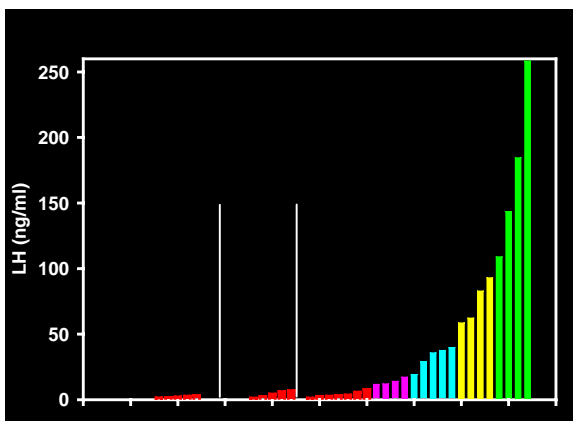
Día 0



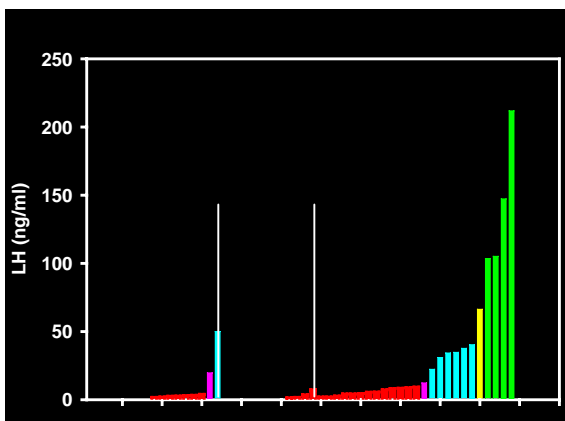
Día 3



Día 7



Día 14



Día 20

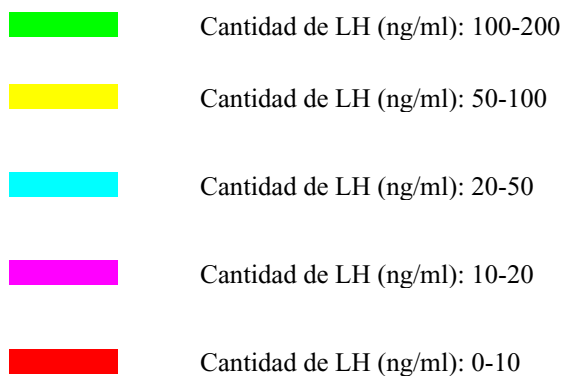
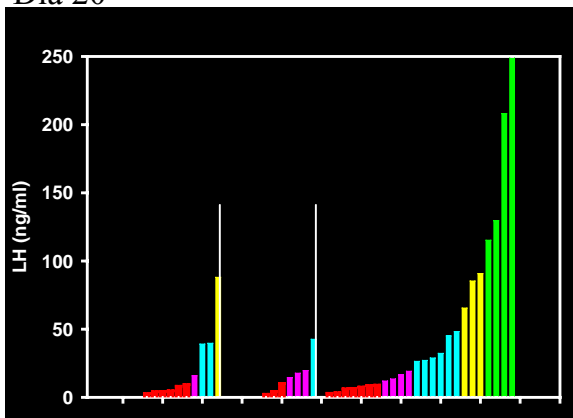


Fig 1.2.5.- Niveles de LHsc (ng/ml) en plasma en los días 0, 3, 7, 14 y 20. Cada gráfica se divide en tres partes. En la primera parte están representados los peces inyectados con pCMVtk-LacZ. En la segunda parte están representados los peces sin inyectar. En la tercera parte están representados los peces inyectados con pCMV-LHsc. Cada barra representa un individuo.

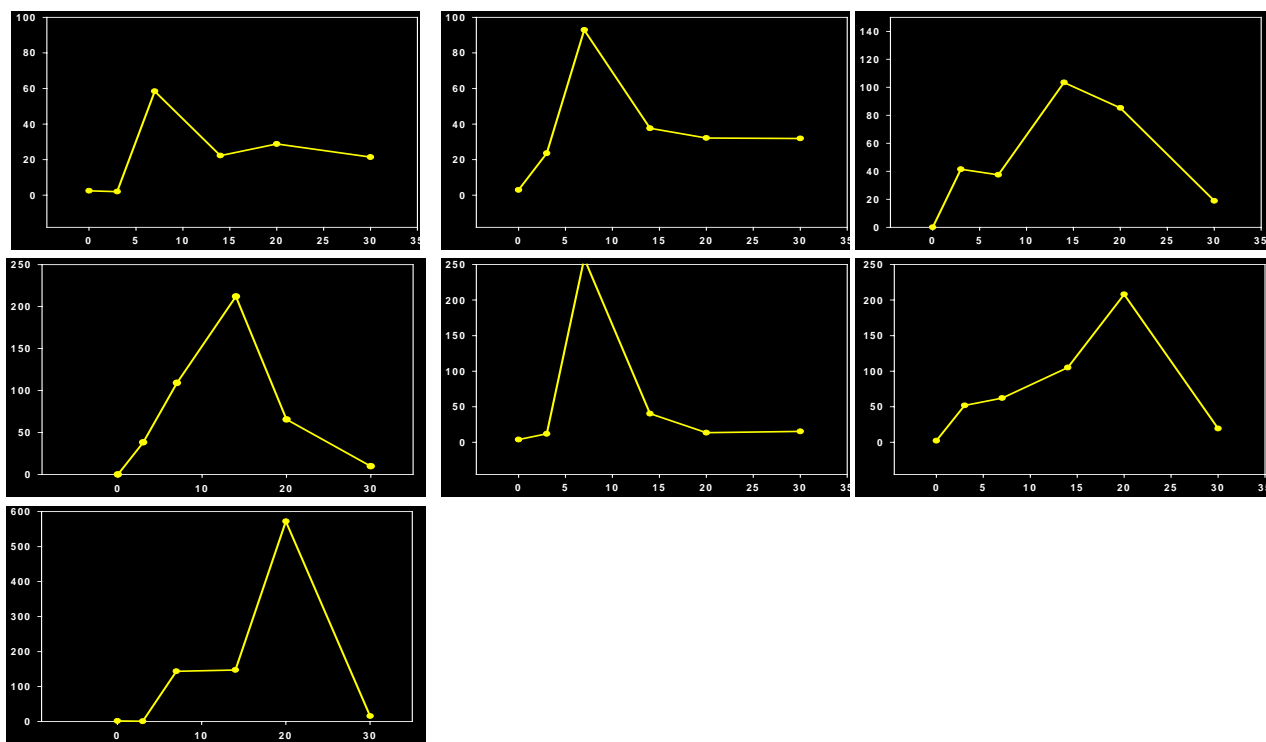


Fig 1.2.6.- Niveles de LH (ng/ml) (eje y) a lo largo del tiempo (días 0, 3, 7, 14, 20 y 30) (eje x) en 7 peces inyectados a día 0 y 3, con pCMV-LHsc (100 μ g). Cada gráfica representa un pez distinto.

1.2.4.- DISCUSIÓN

Para evaluar la eficiencia de la transferencia génica somática como método para la liberación de proteínas a la circulación sanguínea, se utilizó la gonadotropina LH de lubina como secuencia génica a introducir, y el músculo de lubina como órgano diana.

Esta es la primera vez que se demuestra que la transferencia génica somática en peces puede resultar de utilidad en aplicaciones fisiológicas. El único antecedente existente en peces, utilizando este tipo de estrategia para liberar un producto al torrente sanguíneo, consistió en la inyección intramuscular en trucha de una secuencia de DNA que codifica un anticuerpo de una sola cadena contra el virus VHSV, detectándose posteriormente la presencia de anticuerpos circulantes en el pez (Lorenzen *et al.* 2000). Hasta el momento no se había ensayado esta técnica para secretar una hormona en peces; únicamente se había probado la capacidad de un plásmido para secretar luciferasa en células de pez (Collet & Secombes 2005).

Otros dos grupos han demostrado recientemente la funcionalidad de construcciones de gonadotropinas basadas en una sola cadena de DNA en peces. Así, se han fusionado los genes que codifican las subunidades α y β de la LH de la trucha (*Brachymystax lenok tsinlingensis*) (Choi *et al.* 2003) y de la tilapia (Kasuto & Levavi-Sivan 2005). Sin embargo, en nuestro trabajo es la primera vez que se utiliza el CTP humano como espaciador entre las subunidades. Se ha demostrado que este péptido contribuye a aumentar la secreción y la vida media circulatoria de la hCG.

Las construcciones codificando LH recombinantes de trucha (*Brachymystax lenok tsinlingensis*) y tilapia se han sintetizado y secretado de forma correcta en sistemas de expresión heterólogos *in vitro* (Choi *et al.* 2003; Kasuto & Levavi-Sivan 2005). En nuestro estudio se ha demostrado que las células musculares de la lubina, como sistema homólogo de expresión *in vivo*, son capaces de sintetizar y secretar este tipo de proteínas. Por otro lado, hemos conseguido evitar los problemas de disociación asociados a la producción de gonadotropinas recombinantes, consiguiendo una hormona estable y

secretable. Sin embargo, el método carece de robustez y reproducibilidad dada la gran variabilidad individual encontrada entre los peces inyectados. Se necesitan, por lo tanto, más estudios para poder controlar los factores que originan esta variabilidad. Por otra parte, parece que las inyecciones sucesivas de DNA tengan un efecto aditivo en la proteína producida y secretada, ya que a los tres días de la primera inyección (día 3) los niveles de LH obtenidos fueron significativamente más bajos que los obtenidos a los cuatro días de la segunda inyección (día 7), cuando ya se había solapado el efecto de ambas inyecciones. A pesar de sus limitaciones, esta aproximación puede ser muy útil para estudios básicos sobre la función y la estructura de las gonadotrofinas en peces, y para la evaluación de diferentes análogos de estas hormonas.

En muchas especies de peces crecidos en cautividad, suelen aparecer disfunciones reproductivas que impiden que los peces completen la oogénesis o la espermatogénesis (Zohar & Mylonas 2001). Para superar este problema se suele recurrir al uso de proteínas recombinantes heterólogas (GTHs o GnRH, factor liberador de gonadotrofinas), cuya producción en ocasiones resultan difícil de conseguir (Chang *et al.* 2002). Además, estas hormonas se administran varias veces, de forma consecutiva, en este tipo de tratamientos. Debido a su origen heterólogo el organismo receptor puede generar una respuesta inmune frente a ellas, inactivándolas. La transferencia somática de gonadotrofinas de una sola cadena de DNA, podría evitar el uso de hormonas heterólogas, y podría utilizarse a modo de terapia génica para resolver problemas reproductivos. Así mismo, se alcanzaría un mayor beneficio económico, si se pudiese controlar de forma artificial el ritmo de puestas, a fin de conseguir una sincronización y optimización de la recogida de huevos y larvas o bien, una extensión de las puestas para ofrecer peces al mercado durante todo el año (Zohar & Mylonas 2001).

Dado el número de peces donde ya se han clonado los genes que codifican las GTHs, se propone el uso de esta aproximación en estudios *in vivo*, como alternativa a la laboriosa y costosa producción de hormonas recombinantes.

Bibliografia

- Ben Menahem D 2004 Single chain variants of the glycoprotein hormones and their receptors as tools to study receptor activation and for analogue design. *Journal of Neuroendocrinology* **16** 171-177.
- Ben Menahem D, Jablonka-Shariff A, Hyde R, Pixley M, Gilbert D & Boime I 1999 The orientation of the gonadotropin alpha and beta domains in a single chain affects the heterodimeric interaction of the subunits. *Biology of Reproduction* **60** 274.
- Ben Menahem D, Jablonka-Shariff A, Hyde RK, Pixley MR, Srivastava S, Berger P & Boime I 2001 The position of the alpha and beta subunits in a single chain variant of human chorionic gonadotropin affects the heterodimeric interaction of the subunits and receptor-binding epitopes. *Journal of Biological Chemistry* **276** 29871-29879.
- Ben Menahem D, Kudo M, Pixley MB, Sato A, Suganuma N, Perlas E, Hsueh AJW & Boime I 1997 The biologic action of single-chain choriogonadotropin is not dependent on the individual disulfide bonds of the beta subunit. *Journal of Biological Chemistry* **272** 6827-6830.
- Chang CC, Tsai CT & Chang CY 2002 Structural restoration of inactive recombinant fish growth hormones by chemical chaperonin and solvent restraint approaches. *Protein Eng* **15** 437-441.
- Choi EJ, Jin DH & Sohn YC 2003 Gonadotropins in the Manchurian trout, *Brachymystax lenok tsinlingensis*. *Fish Physiology and Biochemistry* **28** 89-90.
- Collet B & Secombes CJ 2005 Construction and analysis of a secreting expression vector for fish cells. *Vaccine* **23** 1534-1539.
- Combarrous Y 1992 Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocr.Rev.* **13** 670-691.
- Fares FA, Yamabe S, Ben Menahem D, Pixley M, Hsueh AJW & Boime I 1998 Conversion of thyrotropin heterodimer to a biologically active single-chain. *Endocrinology* **139** 2459-2464.
- Garcia-Campayo V & Boime I 2001 Novel recombinant gonadotropins. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **12** 72-77.
- Garcia-Campayo V, Sato A, Hirsch B, Sugahara T, Muyan M, Hsueh AJW & Boime I 1997 Design of stable biologically active recombinant lutropin analogs. *Nature Biotechnology* **15** 663-667.
- Hanahan D 1983 Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166** 557-580.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK & Pease LR 1989 Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77** 51-59.
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK & Pease LR 1989 Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77** 61-68.
- Kamei H, Ohira T, Yoshiura Y, Uchida N, Nagasawa H & Aida K 2003 Expression of a biologically active recombinant follicle stimulating hormone of Japanese Eel *Anguilla japonica* using methylotropic yeast, *Pichia pastoris*. *Gen.Comp.Endocrinol.* **134** 244-254.

- Kasuto H & Levavi-Sivan B 2005 Production of biologically active tethered tilapia LHbetaalpha by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gen.Comp Endocrinol.* **140** 222-232.
- Kumar TR, Palapattu G, Wang P, Woodruff TK, Boime I, Byrne MC & Matzuk MM 1999 Transgenic models to study gonadotropin function: The role of follicle-stimulating hormone in gonadal growth and tumorigenesis. *Molecular Endocrinology* **13** 851-865.
- Li X, Franz J, Lottspeich F & Gotz R 1997 Recombinant fish neurotrophin-6 is a heparin-binding glycoprotein: implications for a role in axonal guidance. *Biochem.J.* **324** 461-466.
- Loewen MC, Liu X, Davies PL & Daugulis AJ 1997 Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **48** 480-486.
- Lorenzen N, Cupit PM, Einer-Jensen K, Lorenzen E, Ahrens P, Secombes CJ & Cunningham C 2000 Immunoprophylaxis in fish by injection of mouse antibody genes. *Nat.Biotechnol.* **18** 1177-1180.
- Martinez-Barbera JP, Pendon C, Rodriguez RB, Perez-Sanchez J & Valdivia MM 1994 Cloning, expression, and characterization of a recombinant gilthead seabream growth hormone. *Gen.Comp Endocrinol.* **96** 179-188.
- Mateos J, Mañanos E, Govoroun M, Breton B, Carrillo M & Zanuy S 2005 Purificación de las gonadotrofinas, FSH y LH de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) y diseño de un ELISA para la LH. *Proceedings of the Seventh National Conference of Aquaculture.Las Palmas de Gran Canaria.Spain.P166.*
- Mateos J, Mananos E, Martinez-Rodriguez G, Carrillo M, Querat B & Zanuy S 2003 Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (alpha, FSHbeta, and LHbeta) and their expression during the reproductive cycle. *Gen.Comp Endocrinol.* **133** 216-232.
- Minagawa S, Hikima J, Hirono I, Aoki T & Mori H 2001 Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells. *Dev.Comp Immunol.* **25** 439-445.
- Muyan M, Ruddon RW, Norton SE, Boime I & Bedows E 1998 Dissociation of early folding events from assembly of the human lutropin beta-subunit. *Molecular Endocrinology* **12** 1640-1649.
- Okuno A, Hasegawa Y, Nishiyama M, Ohira T, Ko R, Kurihara M, Matsumoto S & Nagasawa H 2002 Preparation of an active recombinant peptide of crustacean androgenic gland hormone. *Peptides* **23** 567-572.
- Pierce JG & Parsons TF 1981 Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu.Rev.Biochem.* **50** 465-495.
- Schulz RW, Vischer HF, Cavaco JE, Santos EM, Tyler CR, Goos HJ & Bogerd J 2001 Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **129** 407-417.
- Solomon RG & Appels R 1999 Stable, high-level expression of a type I antifreeze protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr.Purif.* **16** 53-62.
- Sugahara T, Grootenhuis PDJ, Sato A, Kudo M, BenMenahem D, Pixley MR, Hsueh AJW & Boime I 1996 Expression of biologically active fusion genes encoding the common alpha subunit and either the CG beta or FSH beta subunits: Role of a linker sequence. *Molecular and Cellular Endocrinology* **125** 71-77.

Zohar Y & Mylonas CC 2001 Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* **197** 99-136.

CAPÍTULO 2

EL SISTEMA DE REGULACIÓN POR TETRACICLINA

2.1.- NUEVO MÉTODO PARA OBTENER EN UN SOLO PASO CLONES QUE EXPRESEN EL SISTEMA DE REGULACIÓN POR TETRACICLINA

El trabajo recogido en este capítulo ha dado lugar a la siguiente publicación:

Muñoz, I., Gómez, A., Zanuy, S., Carrillo, M., 2004

A one-step approach to obtain cell clones expressing tetracycline-responsive transactivators

Anal. Biochem. 331, 153-160

2.1.1.- INTRODUCCIÓN

El control de la expresión de genes exógenos es necesario tanto en estudios de función génica, como en el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas y biomédicas en mamíferos y otros sistemas eucariotas. Entre los sistemas de regulación de la expresión génica utilizados en eucariotas, el sistema de regulación inducible por tetraciclina (Gossen & Bujard 1992) se ha convertido en el método más utilizado en los últimos años. El sistema consiste en dos componentes; uno de ellos es una proteína de fusión (tTA) entre el dominio de unión al DNA del represor TetR de *Escherichia coli*, y el dominio de activación transcripcional de la proteína VP16 del virus del herpes simple, y actúa como un transactivador fuerte. La expresión de este gen híbrido se encuentra generalmente bajo el control de un promotor constitutivo. El segundo componente contiene el gen de interés bajo el control de un promotor mínimo hCMV, que está precedido de varias copias del operador de la resistencia a tetraciclina de *E. coli* (*tetO*). En ausencia de tetraciclina, o alguno de sus derivados, el transactivador tTA se une al operador y se inicia la transcripción. Sin embargo, en presencia de tetraciclina el transactivador tTA se une al antibiótico. Esto origina en él un cambio conformacional que lo inhabilita para unirse al operador e iniciar la transcripción. A este sistema se le conoce como *tet-off*. Existe otra versión del sistema (*tet-on*) que está basada en una proteína de fusión (rtTA), originada mediante mutagénesis al azar del transactivador original tTA, y que es capaz de unirse a las secuencias del operador *tetO* solamente en presencia del inductor (Gossen *et al.*, 1995). Este sistema es especialmente útil cuando sólo se requiere la expresión del gen de interés en periodos cortos de tiempo, o cuando no es conveniente una exposición prolongada al antibiótico. Debido a que TetR y *tetO* interactúan específicamente entre ellos, y a su origen procariota, este sistema no interfiere con la maquinaria eucariota. Esto evita muchos de los problemas que han invalidado otros métodos de regulación exógena de la expresión. Además, el inductor utilizado, la tetraciclina, no presenta efectos adversos ya que dosis infraterapéuticas son

suficientes para activar el sistema. A pesar del enorme potencial del sistema de regulación por tetraciclina, su aplicación no siempre resulta eficiente.

La expresión estable del sistema de regulación por tetraciclina en líneas celulares presenta distintos problemas. La obtención de una línea celular en la que se pueda controlar la expresión de genes exógenos implica un proceso largo, que incluye varios pasos. En primer lugar, se introduce, de manera estable, el transactivador en la línea celular, y se seleccionan aquellos clones que expresan el transactivador de manera funcional. En un segundo paso, se introduce el plásmido que contiene, el gen a regular bajo el control del promotor *tetO*. Finalmente, se realiza un segundo cribado para encontrar un clon regulable por tetraciclina (Gossen & Bujard 1992; Gossen *et al.* 1995). Una de las mayores dificultades de este proceso reside en establecer una línea celular primaria que exprese el transactivador de manera estable. Durante el proceso de identificación y selección de los clones positivos, muchos de ellos pierden su capacidad reguladora debido a fenómenos de silenciamiento de la expresión del transactivador. Esta pérdida de expresión del transactivador puede deberse a dos razones. Por una parte, parece existir una selección en contra de las células donde el nivel intracelular de transactivador es alto, debido posiblemente, a la toxicidad del dominio VP16 para algunas líneas celulares (Gossen & Bujard 1992; Gallia & Khalili 1998). Por otro lado, el sistema puede presentar cierta inestabilidad epigenética, debido al origen del promotor utilizado para la expresión del transactivador (Gilbert 1989; Pikaart *et al.* 1998). La aparición frecuente de fenómenos de silenciamiento dificulta la labor de encontrar un clon donde la expresión del gen de interés se regule eficazmente por tetraciclina. El sistema *tet-on* presenta problemas adicionales, ya que rtTA muestra cierta afinidad residual por *tetO*, aún en ausencia de inductor. Esto complica la labor de encontrar clones con niveles de expresión basal bajos y una buena regulación. Además, la capacidad de respuesta al sistema de regulación por tetraciclina es distinta dependiendo del tipo celular (Howe *et al.* 1995; Gossen & Bujard 1995; Ackland-Berglund & Leib 1995; Hoffmann *et al.* 1997; Akagi *et al.* 2001), incluso existen casos en los que no se ha conseguido establecer el sistema (Hoffmann *et al.* 1997; Holzenberger *et al.* 2000).

Para salvar este tipo de inconvenientes se han ideado diversas estrategias, como por ejemplo el uso de sistemas autorregulados en los que la expresión del transactivador está a su vez controlada por tetraciclina (Mohammadi & Hawkins 1998; Strathdee *et al.* 1999). A pesar de obtenerse una regulación óptima, se han descrito problemas de citotoxicidad al usar este tipo de sistemas autorregulados (Gallia & Khalili 1998). Para aumentar el porcentaje de éxito a la hora de establecer el sistema, algunos autores han sustituido el dominio VP16 por dominios activadores de otra naturaleza (Baron *et al.* 1997; Urlinger *et al.* 2000; Akagi *et al.* 2001), han utilizado promotores diferentes a CMV para dirigir la expresión del transactivador (Gopalkrishnan *et al.* 1999; Anastassiadis *et al.* 2002), o han realizado modificaciones en el promotor que responde a tetraciclina (Hoffmann *et al.* 1997; Rose & MacDonald 1997). A pesar de la introducción de estas mejoras, el proceso de búsqueda y selección de clones apropiados, que contengan el sistema de regulación por tetraciclina, es largo y tedioso.

Para facilitar la obtención de clones que contengan el sistema de regulación por tetraciclina se describe, en este subcapítulo, una estrategia basada en el uso de un nuevo vector, pTet-luc⁺-pur/GFP. Este plásmido contiene, bajo el control del promotor bidireccional P_{bi-1} capaz de responder a tetraciclina (Baron *et al.* 1995), el gen de la luciferasa, y un gen que codifica una proteína de fusión entre la resistencia a puromicina (*pac*) y la proteína verde fluorescente (EGFP). En este trabajo, se ha utilizado el gen de la luciferasa para poder cuantificar de forma precisa el funcionamiento del plásmido, pero este gen puede sustituirse por cualquier gen cuya expresión se requiera controlar. La ventaja principal que aporta este plásmido es que, una vez cotransfectado con los plásmidos pTet-Off o pTet-On, sólo aquellos clones que, expresan el transactivador de una manera funcional son capaces de sobrevivir en condiciones de inducción y selección con puromicina. Esta nueva estrategia nos ha permitido obtener, en un solo paso, un porcentaje de clones positivos mayor que el descrito previamente en otros trabajos. Además, la monitorización de la expresión de la GFP, controlada a su vez por el promotor que responde a tetraciclina, permite una caracterización rápida de los clones *in vivo*.

2.1.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Plásmidos de expresión en células eucariotas

pTet-On y **pTet-Off** (Clontech Labs, Palo Alto, CA) contienen, respectivamente, los genes híbridos rtTA y tTA bajo el control del promotor y potenciador hCMV.

El plásmido **pTet-luc+-pur/GFP**, que responde a la tetraciclina, está basado en el vector pBI-4 (Baron *et al.*, 1995). Éste contiene un promotor bidireccional capaz de responder a tetraciclina (P_{bi-1}), formado por 7 copias del operador *tetO* flanqueadas por dos promotores mínimos hCMV (fig 2.1.1).

Para construir pTet-luc+-pur/GFP, el gen de la luciferasa de luciernaga (*luc+*) se insertó como un fragmento *PstI-NaeI* en los sitios *PstI* y *SalI* /Klenow de uno de los lados del promotor P_{bi-1} de pBI-4, y el gen de fusión *pac/EGFP* se insertó como un fragmento *NheI-ClaI* al otro lado promotor. El gen *pac/EGFP* se aisló del plásmido pCVpf (Yunhan Hong, no publicado) y codifica una proteína híbrida entre el producto del gen *pac*, que confiere resistencia a puromicina, y la proteína verde fluorescente (EGFP).

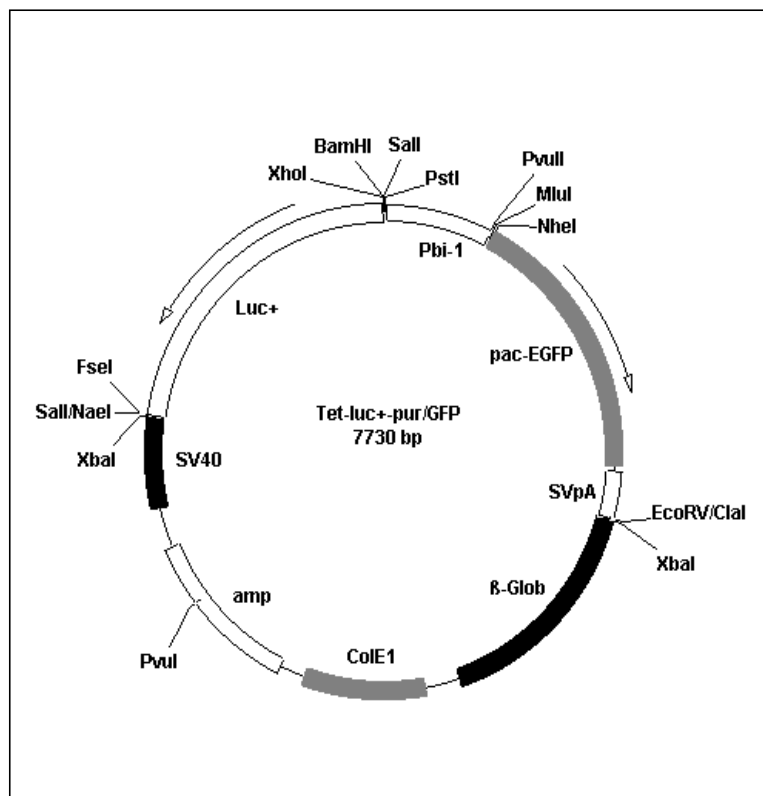


Figura 2.1.1.- Mapa esquemático del plásmido pTet-luc⁺-pur/GFP. El gen de la luciferasa (*luc*⁺) y el gen *pac/EGFP*, que codifica una proteína de fusión entre EGFP y la resistencia a puromicina, se encuentran bajo el control del promotor bidireccional P_{bi-1}. SV40, SVpA y β-glob son fragmentos que contienen señales de poliadenilación. *bla* y ColE1 son respectivamente, el gen de resistencia a ampicilina, β-lactamasa, y un origen de replicación para la propagación del plásmido en *E. coli*.

Obtención del DNA plasmídico

Para la propagación de los diferentes plásmidos se transformó *Escherichia coli* DH5α siguiendo el método de Hanahan (Hanahan 1983). El DNA plasmídico se purificó utilizando cromatografía de intercambio aniónico (Qiagen Inc. Chatsworth, Calif).

Cultivo celular y transfecciones

Las células HEK 293, procedentes de tejido embrionario de riñón humano, se mantuvieron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) con un 10% de suero bovino fetal, L-glutamina (2mM), penicilina (100 unidades/ml), estreptomina (100 unidades/ml), y anfotericina B (0.25 μg/ml). Las células se transfectaron usando FuGENE (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. pTet-Off o pTet-On

(0.3 μg) y pTet-luc+-pur/GFP (0.1 μg) se cotransfectaron en células creciendo en placas de 24 pocillos (80% de confluencia). En los análisis de expresión transitoria, las células se recogieron 48 h después de inducirse. Para generar clones estables, las células se recogieron 48 horas después de la transfección, se sembraron en placas de 96 pocillos y se seleccionaron en medio con puromicina (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), para los clones que contenían el sistema *tet-off* (clones tTA), o con puromicina y doxiciclina para los clones que contenían el sistema *tet-on* (clones rtTA). Para estudiar la cinética de expresión de los genes, los clones seleccionados se sembraron en placas de 12 pocillos. Cuando alcanzaron un 80% de confluencia se incubaron con medio que contenía doxiciclina (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), hidrocloreuro de tetraciclina (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o sin antibióticos durante diez días.

Ensayo de la luciferasa y la proteína verde fluorescente

Para medir la actividad luciferasa, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se lisaron con *Passive Lysis Buffer* (Promega). El material insoluble se eliminó por centrifugación (15000 g durante 20 min). Se mezclaron 20 μl del sobrenadante con 200 μl del reactivo luciferina (20 mM TricinaKOH, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 8 mM MgCl_2 , 33.3 mM DTT, 270 μM CoA, 530 μM ATP, 400 μM luciferina). La luz emitida se midió en un luminómetro (*Junior*, EG&G, Berthold) y se expresó como unidades relativas de luciferasa (RLU).

La fluorescencia debida a la GFP se midió, a partir de 300 μl del lisado celular, con un espectrofotómetro de fluorescencia (F-2500, Hitachi). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 485 y 508 nm, respectivamente. La expresión de GFP se monitorizó en las células en cultivo mediante un microscopio de fluorescencia (Olympus IX71). La cantidad de proteína se determinó utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad), y albúmina de suero bovina (Sigma) como patrón.

2.1.3.- RESULTADOS

Construcción y expresión transitoria del plásmido pTet-luc+-pur/GFP

Para obtener el plásmido pTet-luc+-pur/GFP, se situó el gen de fusión *pac/EGFP* y el gen de la luciferasa bajo el control del promotor bidireccional regulable por tetraciclina P_{bi-1} (Baron *et al.* 1995). En condiciones de inducción, esta nueva construcción permite la expresión de ambos genes cuando está presente un transactivador, tTA o rtTA, funcional. Para evaluar el comportamiento del plásmido se realizaron transfecciones transitorias en células 293 HEK. Se cotransfectó el plásmido pTet-luc+-pur/GFP con pTet-Off o pTet-On. Cuando se empleó tTA como transactivador, se alcanzó una inducción de veinticinco veces en medio sin doxiciclina. Además, el nivel de actividad luciferasa en presencia de doxiciclina era muy bajo. Cuando se cotransfectó pTet-luc+-pur/GFP con rtTA, se logró inducir la expresión de luciferasa ocho veces por encima del nivel basal. Este nivel basal en condiciones de no inducción fue mayor que el obtenido con tTA (tabla 2.1.1). En todos los casos, se encontró una buena correlación entre la GFP observada y la actividad luciferasa.

Establecimiento de líneas de células inducibles

Inicialmente, se cotransfectaron los plásmidos pTet-luc+-pur/GFP y pTet-Off o pTet-On en las células 293 HEK. Para controlar la eficiencia de la transfección se midió la actividad luciferasa en algunos pocillos, con o sin doxiciclina, a las 48 horas (datos no mostrados). Las células restantes se mantuvieron en condiciones de inducción y selección con puromicina durante tres semanas. De esta manera sólo aquellos clones que contengan un transactivador funcional podrán sobrevivir a la selección con puromicina, y además, deberían expresar GFP y luciferasa. Tras el primer mes de selección hubo una ligera reducción del número de clones (3-6%) que inicialmente expresaban GFP. Se escogieron 30 clones al azar para realizar un estudio más profundo de su capacidad de regulación. Estos clones se mantuvieron durante cuatro días en presencia o ausencia de doxiciclina. Aproximadamente, la mitad de ellos

mostraban expresión de luciferasa y GFP dependiente de doxiciclina (tabla 2.1.2). De los 30 clones analizados para cada transactivador, sólo 2 clones rtTA y 3 clones tTA mostraron regulación de la GFP exclusivamente, no pudiendo regularse la expresión de luciferasa.

TABLA 2.1.1.- Actividad luciferasa en células HEK 293 transfectadas con distintos transactivadores y el plásmido pTet-luc+-pur/GFP

Plásmidos	RLU ^a		Factor de activación ^d
	Dox (+) ^b	Dox (-) ^c	
pTet-Off	1561 ± 56	39700 ± 7050	25
pTet-On	74350 ± 95	9600 ± 95	8

^a Unidades relativas de luz, determinadas como se ha descrito en Material y Métodos

^b Dox (+): presencia de doxiciclina (2 µg/ml)

^c Dox (-): ausencia de doxiciclina (2 µg/ml)

^d RLU en estado de inducción/RLU en estado de no inducción

TABLA 2.1.2.- Caracterización de los clones obtenidos después de cotransfectar de manera estable las células HEK 293 con Tet-luc+-pur/GFP y los plásmidos conteniendo distintos transactivadores

	Clones analizados	GFP y LUC no reguladas ^a	Regulación de GFP exclusivamente ^a	GFP y LUC reguladas ^a
pTet-Off	30	10	3	17
pTet-On	30	14	2	14

^a número de clones

Cinética de la actividad luciferasa y de la fluorescencia de la GFP bajo el control del sistema *tet-off*

Para poder determinar las propiedades de los clones que contienen de forma estable los plásmidos pTet-Off y pTet-luc+-pur/GFP, se analizó la cinética de la expresión de la luciferasa y la GFP en dos clones, 1-tTA y 11-tTA. Se utilizó doxiciclina o tetraciclina para poder comparar el efecto de ambos antibióticos. Partiendo de los clones totalmente inducidos (100% de actividad), lo que corresponde a una actividad luciferasa de 7×10^5 RLU/ μ g de proteína como media, se añadió doxiciclina o tetraciclina al medio para silenciar la expresión. Veinticuatro horas después de añadir tetraciclina, la actividad luciferasa y la fluorescencia descendieron aproximadamente hasta el 20% de sus valores iniciales. A las 72 horas la actividad luciferasa y la fluorescencia alcanzaron niveles basales. El patrón de desaparición de ambas proteínas fue similar cuando se usó doxiciclina. En el clon 1-tTA la cinética de silenciamiento fue ligeramente más lenta, pero se alcanzaron igualmente niveles de expresión basal a las 72 horas (figs 2.1.2A y C). Cabe destacar que ambas proteínas siguieron una cinética muy similar.

Posteriormente se estudió la cinética de activación de los clones 1 y 11-tTA. Para ello, se silenciaron previamente, incubándolos durante 11 días con tetraciclina o doxiciclina. El nivel basal de actividad luciferasa conseguido por el clon 11-tTA fue menor (300 RLU/ μ g de proteína) que el del clon 1-tTA (800 RLU/ μ g de proteína). Tras eliminar la doxiciclina, sólo se consiguió, después de 264 horas, un aumento de la actividad luciferasa de 400 veces sobre el nivel basal en ambos clones. En cuanto a la GFP apenas se consiguió un aumento significativo sobre el nivel basal (figs 2.1.2B y D). En cambio las células previamente tratadas con tetraciclina alcanzaron niveles máximos de GFP y LUC a las 120 horas. Los niveles de actividad luciferasa obtenidos en este punto (2×10^6 RLU/ μ g como media) están en el mismo rango que los correspondientes al 100% de actividad de las figs 2.1.2A y C, lo que demuestra que la expresión de estos genes se puede recuperar totalmente después de silenciarse con tetraciclina.

El factor de regulación alcanzado para la luciferasa (una inducción de 3400 para 11-tTA y 2100 veces para 1-tTA sobre el nivel basal) fue diez veces mayor que el obtenido para la GFP (300 veces para 11-tTA y 260 veces para 1-tTA). Esta diferencia se debe probablemente a una menor sensibilidad del ensayo de la GFP, lo que no permite una medida precisa de ésta proteína a concentraciones bajas.

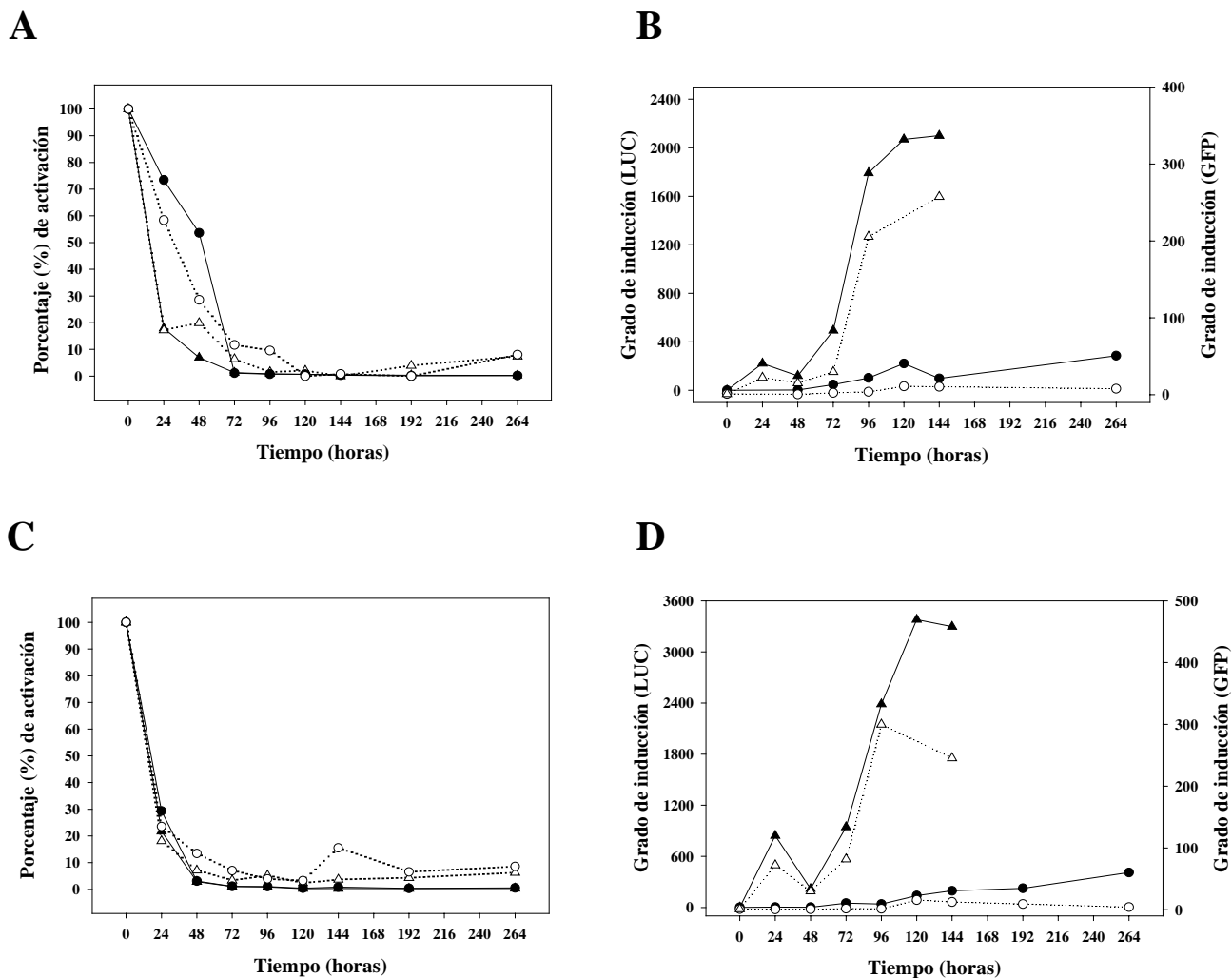


Figura 2.1.2.- Análisis de la cinética del sistema *tet-off*. Clones 1-tTA (A y B) y 11-tTA (C y D). (A y C) Cinética de represión. Los clones 1-tTA (A) y 11-tTA (C) se cultivaron previamente sin tetraciclina para conseguir la máxima expresión de luciferasa y GFP. A tiempo 0, se sembraron en medio con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tetraciclina (triángulos), doxiciclina (círculos) o sin antibiótico (controles inducidos). Se tomaron muestras en los tiempos indicados en la figura. El medio de cultivo se cambió todos los días y se utilizaron antibióticos recién preparados. El porcentaje de activación se calculó como el cociente en cada punto entre la actividad luciferasa (símbolos cerrados) o la fluorescencia de la GFP (símbolos abiertos) de las células tratadas y de las células control inducidas. (B y D) Cinética de inducción. Tras reprimir totalmente el sistema, se recogieron células del clon 1-tTA (B) y del clon 11-tTA (D), se lavaron con PBS y se sembraron en medio libre de antibiótico. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se midió la actividad luciferasa (símbolos cerrados, eje de la izquierda) y GFP (símbolos abiertos, eje de la derecha).

Cinética de la actividad luciferasa y de la fluorescencia de la GFP bajo el control del sistema *tet-on*

Se escogieron dos clones, 13-rtTA y 14-rtTA, que contenían pTet-On y pTet-luc⁺-pur/GFP, y se cultivaron en medio con doxiciclina para inducir la expresión de los genes indicadores. Posteriormente se eliminó la doxiciclina para estudiar su cinética de represión. En el clon 13-rtTA, se observó que la actividad luciferasa y la fluorescencia basada en la GFP decrecían rápidamente al eliminar la doxiciclina, alcanzándose niveles mínimos a las 96 h (fig 2.1.3A). Una vez silenciado, se analizó su cinética de activación tras añadir doxiciclina o tetraciclina al medio. Se observó que la tetraciclina apenas producía efecto, sin embargo los niveles de actividad luciferasa y de fluorescencia aumentaron gradualmente cuando se usó doxiciclina (fig 2.1.3B). La cinética de expresión seguida por el clon 14-rtTA fue más rápida. Cuando el clon completamente activado pasó a crecerse en medio libre de doxiciclina, se consiguió una reducción de la actividad luciferasa de un 80% en las primeras 24 h (fig 2.1.3C), y una recuperación completa de la actividad original 48h después de la adición de doxiciclina (fig 2.1.3D).

Para determinar el grado de regulación de estos clones, se midió la actividad luciferasa después de incubarlos en ausencia o presencia de doxiciclina durante 10 días. El factor de activación conseguido fue de 1000 para el clon 13-rtTA y de 100 para el clon 14-rtTA. El nivel basal de actividad luciferasa en ausencia de doxiciclina fue mucho menor en el clon 14-rtTA que en el clon 13-rtTA (170 RLU/ μ g de proteína vs 1200 RLU/ μ g de proteína).

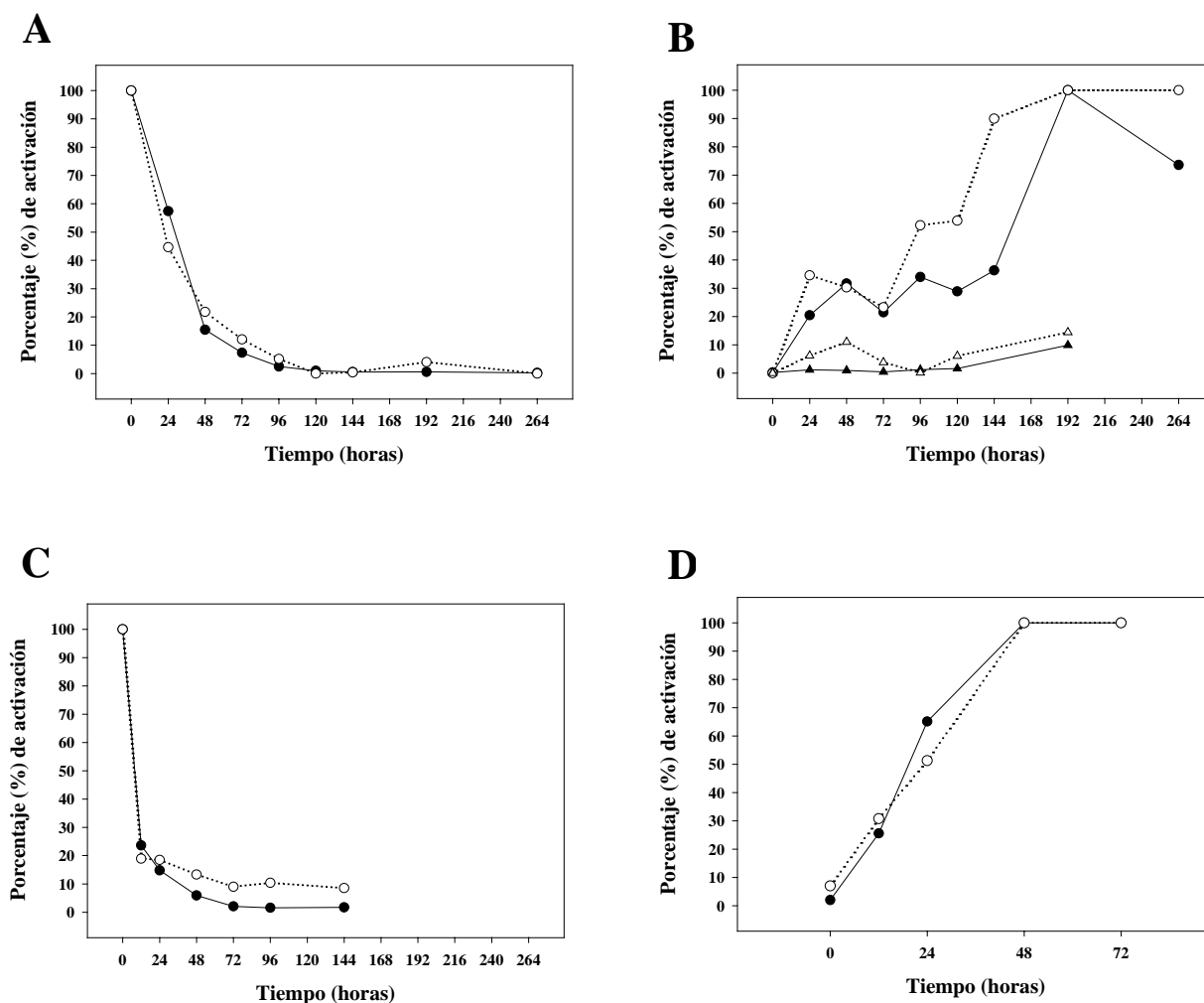


Figura 2.1.3.- Análisis de la cinética del sistema *tet-on*. Clones 13-rtTA (A y B) y 14-rtTA (C y D). (A y C) Cinética de represión. Los clones 13-rtTA (A) y 14-rtTA (C) se cultivaron primero en medio con doxiciclina (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para conseguir la máxima expresión de luciferasa y GFP. A tiempo 0, se lavaron con PBS, se resembraron y posteriormente se cultivaron en medio sin antibiótico o conteniendo 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de doxiciclina (controles inducidos). (B y D) Cinética de inducción. Tras reprimir totalmente el sistema, se recogieron células de los clones 13-rtTA (B) y 11-rtTA (D), y se sembraron en medio conteniendo 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tetraciclina (triángulos) o de doxiciclina (círculos). El medio de cultivo se cambió todos los días, y se utilizaron antibióticos recién preparados. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se midió la actividad luciferasa (símbolos cerrados) y la fluorescencia de la GFP (símbolos abiertos). El porcentaje de activación se calculó como el cociente entre la actividad luciferasa o la fluorescencia de la GFP de las células tratadas y de las células control inducidas.

2.1.4- DISCUSIÓN

El uso del sistema de regulación por tetraciclina está muy extendido en estudios que requieren inducir la expresión de un cierto gen. El establecimiento de este sistema en células *in vitro* es un proceso laborioso debido a la dificultad en: i) encontrar un clon que exprese adecuadamente el transactivador y ii) obtener, tras una segunda ronda de transfección y cribado, una línea celular con un nivel de expresión basal bajo, y una regulación eficiente de la expresión de nuestro gen de interés mediante tetraciclina.

En este subcapítulo, se ha descrito una estrategia que ayuda a identificar líneas celulares que contengan el sistema de regulación por tetraciclina. Está basada en el uso de un nuevo vector, pTet-luc⁺-pur/GFP, regulable por tetraciclina. Esta construcción contiene el gen de la luciferasa y un gen de fusión que codifica una resistencia a puromicina y la EGFP, ambos bajo el control del promotor P_{bi-1} (Baron *et al.* 1995). Cotransfectando este plásmido con aquellos que contienen tTA o rtTA, hemos podido aislar directamente clones que expresan el transactivador de una manera funcional. La selección se realizó en condiciones de inducción, lo que permite la expresión de la resistencia a puromicina en aquellos clones que expresen tTA o rtTA. Con este primer paso se evita que las células que no expresan el transactivador disparen su crecimiento, y por lo tanto disminuye el número de falsos positivos. Tras la selección se realizó una búsqueda cualitativa de los clones regulados por tetraciclina, mediante la observación directa de la GFP en las células. Por último, la medida de la actividad luciferasa nos permitió cuantificar el grado de regulación de cada clon.

Existen otros vectores descritos que usan la GFP (Mosser *et al.* 1997; Callus & Mathey-Prevot 1999) o una resistencia a antibiótico (Chambard & Pognonec 1998) para facilitar la búsqueda de clones regulables por tetraciclina. En nuestro caso, se combina la GFP con la selección con un antibiótico. De esta manera, tras seleccionar los clones resistentes, se puede detectar fácilmente cuales expresan la GFP, como una confirmación de que el transactivador se expresa de manera funcional. Además, la actividad luciferasa proporciona una medida precisa para cuantificar el nivel de transcripción basal e inducido.

Los clones obtenidos suelen presentar una variabilidad alta en el nivel de expresión y el grado de regulación. Esto se debe fundamentalmente a la integración al azar de los genes (Howe *et al.* 1995; Theroux *et al.* 1996; Yin *et al.* 1996; Paulus *et al.* 2000; Zentilin *et al.* 2000; Gould *et al.* 2000). Por tanto, es necesario encontrar un clon que exprese una cantidad de transactivador apropiada para conseguir una buena activación y en el que, a su vez, los niveles basales de expresión del gen de interés sean suficientemente bajos (Yin *et al.* 1996). El sistema descrito aquí sigue siendo susceptible a estos efectos de posición, y por ello, el nivel de inducción y la expresión de la luciferasa variaba mucho entre los clones. Sin embargo, la ventaja principal de este sistema es que la expresión del gen *pac/EGFP* permite una caracterización rápida de cada clon, sin tener que recurrir a análisis más exhaustivos. Nuestros resultados demuestran que la expresión de los genes clonados a ambos lados del promotor bidireccional sigue una cinética muy similar. Por tanto, al reemplazar el gen de la luciferasa por otro gen que se desee estudiar, su expresión puede ser indirectamente monitorizada observando la expresión de la GFP en las células vivas. La expresión de la GFP permite, además, observar si existe heterogeneidad intraclonal, y posibilita la selección de aquellos clones más homogéneos. En aquellos casos donde la proteína de interés necesite fusionarse a una proteína fluorescente, se podría utilizar la proteína roja fluorescente (DsRed) o alguna de las variantes disponibles de la GFP, para evitar interferencias con la fusión *pac/EGFP*.

Algunos autores (Yin *et al.* 1996; Anastassiadis *et al.* 2002) recomiendan no cotransfectar el plásmido que contiene el transactivador con el plásmido que responde a tetraciclina, si se quieren obtener clones con bajo nivel de expresión basal y máxima activación. Los plásmidos cotransfectados suelen integrarse en el mismo sitio del genoma. Esto lleva a que el potenciador del promotor CMV pueda influir sobre el promotor regulado por tetraciclina, generando clones con un nivel alto de expresión basal o incluso con expresión constitutiva (Bergwitz *et al.* 2000). En este trabajo se cotransfectó el plásmido pTet-luc-pur/GFP con el plásmido que contiene el transactivador, y los resultados demuestran que se pueden obtener clones con un nivel basal bajo y una expresión inducida alta. En cualquier caso, se puede usar el plásmido

pTet-luc- pur/GFP en una estrategia clásica de dos rondas para buscar clones positivos conteniendo el transactivador. El uso de este plásmido supone un ahorro considerable de tiempo y trabajo, sobre los métodos tradicionales de búsqueda de clones regulables. Además, ha permitido obtener, con un solo paso, un porcentaje mayor de clones regulables (56% para el *tet-off*, 46 % para el *tet-on*) que en los trabajos previos donde se habían usado los mismos transactivadores y promotores (30% (Van Craenenbroeck *et al.* 2001), 10% (Anastassiadis *et al.* 2002), 20% (Chambard & Pognonec 1998), 32% (Theroux *et al.* 1996), 18% (Shockett *et al.* 1995), 0% (Gopalkrishnan *et al.* 1999; Callus & Mathey-Prevot 1999; Holzenberger *et al.* 2000; Akagi *et al.* 2001; Kenny *et al.* 2002)). También cabe destacar que durante los estudios de la cinética de expresión no se añadió puromicina en condiciones de inducción. Y, sin embargo, no se observó ni un aumento de la heterogeneidad intraclonal, ni pérdida de inducibilidad en estas células. Esto demuestra que una vez los clones están aislados pueden mantenerse sin presión de selección.

También se ha determinado la capacidad de dos análogos distintos, doxiciclina e hidroclicloruro de tetraciclina, para regular la expresión génica. No se encontró ninguna diferencia entre ambos para reprimir la expresión de luciferasa en los clones tTA. Sin embargo, la inducción era mucho más lenta cuando se había tratado previamente doxiciclina, al igual que ocurría en otros trabajos (Mohammadi *et al.* 1997). Por tanto, es recomendable reprimir el sistema *tet-off* con tetraciclina, si se quiere inducir la expresión del gen de interés de una manera rápida. En los clones que contienen rtTA, la doxiciclina fue mucho más efectiva para activar la expresión de los genes que la tetraciclina, que apenas afectaba la expresión. En trabajos previos con el sistema *tet-on* llegaron a la misma conclusión (Gossen *et al.* 1995). Las mutaciones presentes en rtTA afectan a los residuos implicados en los cambios conformacionales que ocurren en TetR después de unirse a la tetraciclina, lo que probablemente le confiere características estructurales distintas al TetR original (Hinrichs *et al.* 1994). Como resultado, sólo aquellos análogos de la tetraciclina que muestran una mayor afinidad por el TetR original, como la anhidrotetraciclina o la doxiciclina, son efectivos en la unión con rtTA, mientras que otros que originalmente muestran una menor afinidad,

como el hidrocloreto de tetraciclina, no son unos inductores efectivos (Degenkolb *et al.* 1991; Gossen *et al.* 1995).

En conclusión, se ha desarrollado y evaluado una estrategia nueva para seleccionar clones que expresen de una manera estable y eficiente todos los componentes del sistema de regulación por tetraciclina. Hemos demostrado que usando herramientas y estrategias adecuadas es posible aislar, de una manera fácil, clones regulables que contengan los transactivadores tetR/VP16 originales bajo el control del promotor CMV. En el plásmido pTet-luc-pur/GFP, la luciferasa se puede sustituir por otro gen, y obtenerse clones regulables en un sólo paso, tal y como se ha demostrado en este trabajo. En aquellos casos donde la selección en condiciones de inducción no sea posible (ej. expresión de una toxina), el plásmido pTet-luc⁺-pur/GFP se puede usar para detectar fácilmente qué clones expresan el transactivador, transfectando a continuación el gen de interés bajo el control de un promotor inducible por tetraciclina.

Bibliografía

- Ackland-Berglund CE & Leib DA 1995 Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *Biotechniques* **18** 196-200.
- Akagi K, Kanai M, Saya H, Kozu T & Berns A 2001 A novel tetracycline-dependent transactivator with E2F4 transcriptional activation domain. *Nucleic Acids Res.* **29** E23.
- Anastassiadis K, Kim J, Daigle N, Sprengel R, Scholer HR & Stewart AF 2002 A predictable ligand regulated expression strategy for stably integrated transgenes in mammalian cells in culture. *Gene* **298** 159-172.
- Baron U, Freundlieb S, Gossen M & Bujard H 1995 Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* **23** 3605-3606.
- Baron U, Gossen M & Bujard H 1997 Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: Novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Research* **25** 2723-2729.
- Bergwitz C, Wendlandt T, Potter E, Glomb I, Gras K, von zur MA & Brabant G 2000 A versatile chondrogenic rat calvaria cell line R-tTA-24 that permits tetracycline-regulated gene expression. *Histochem. Cell Biol.* **113** 145-150.
- Bieschke ET, Wheeler JC & Tower J 1998 Doxycycline-induced transgene expression during *Drosophila* development and aging. *Mol. Gen. Genet.* **258** 571-579.

- Callus BA & Mathey-Prevot B 1999 Rapid selection of tetracycline-controlled inducible cell lines using a green fluorescent-transactivator fusion protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **257** 874-878.
- Chambard JC & Pognonec P 1998 A reliable way of obtaining stable inducible clones. *Nucleic Acids Res* **26** 3443-3444.
- Degenkolb J, Takahashi M, Ellestad GA & Hillen W 1991 Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor. *Antimicrob.Agents Chemother.* **35** 1591-1595.
- Furth PA, St Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H & Hennighausen L 1994 Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **91** 9302-9306.
- Gallia GL & Khalili K 1998 Evaluation of an autoregulatory tetracycline regulated system. *Oncogene* **16** 1879-1884.
- Gilbert DM 1989 *Temporal order of DNA replication in eukariotic cells: its relationship to gene expression*. In:Genetics. Standford, CA: Standford University Press.
- Gopalkrishnan RV, Christiansen KA, Goldstein NI, DePinho RA & Fisher PB 1999 Use of the human EF-1alpha promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **27** 4775-4782.
- Gossen M & Bujard H 1992 Tight Control of Gene-Expression in Mammalian-Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** 5547-5551.
- Gossen M & Bujard H 1995 Efficacy of Tetracycline-Controlled Gene-Expression Is Influenced by Cell-Type - Commentary. *Biotechniques* **19** 213-216.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W & Bujard H 1995 Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268** 1766-1769.
- Gould DJ, Berenstein M, Dreja H, Ledda F, Podhajcer OL & Chernajovsky Y 2000 A novel doxycycline inducible autoregulatory plasmid which displays "on"/"off" regulation suited to gene therapy applications. *Gene Ther.* **7** 2061-2070.
- Hanahan D 1983 Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166** 557-580.
- Hinrichs W, Kisker C, Duvel M, Muller A, Tovar K, Hillen W & Saenger W 1994 Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* **264** 418-420.
- Hoffmann A, Villalba M, Journot L & Spengler D 1997 A novel tetracycline-dependent expression vector with low basal expression and potent regulatory properties in various mammalian cell lines. *Nucleic Acids Res* **25** 1078-1079.
- Holzenberger M, Zaoui R, Leneuve P, Hamard G & Le Bouc Y 2000 Ubiquitous postnatal LoxP recombination using a doxycycline auto-inducible Cre transgene (DAI-Cre). *Genesis.* **26** 157-159.

- Howe JR, Skryabin BV, Belcher SM, Zerillo CA & Schmauss C 1995 The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J.Biol.Chem.* **270** 14168-14174.
- Izumi M & Gilbert DM 1999 Homogeneous tetracycline-regulatable gene expression in mammalian fibroblasts. *J Cell Biochem* **76** 280-289.
- Kenny PA, Enver T & Ashworth A 2002 Retroviral vectors for establishing tetracycline-regulated gene expression in an otherwise recalcitrant cell line. *BMC.Mol.Biol.* **3** 13.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lubbert H & Bujard H 1996 Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** 10933-10938.
- Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhoose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG & Mansuy IM 2001 Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* **104** 675-686.
- Mansuy IM, Winder DG, Moallem TM, Osman M, Mayford M, Hawkins RD & Kandel ER 1998 Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron* **21** 257-265.
- Mohammadi S, Alvarez-Vallina L, Ashworth LJ & Hawkins RE 1997 Delay in resumption of the activity of tetracycline-regulatable promoter following removal of tetracycline analogues. *Gene Ther* **4** 993-997.
- Mohammadi S & Hawkins RE 1998 Efficient transgene regulation from a single tetracycline-controlled positive feedback regulatory system. *Gene Ther* **5** 76-84.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Jolicoeur P & Massie B 1997 Use of a dicistronic expression cassette encoding the green fluorescent protein for the screening and selection of cells expressing inducible gene products. *Biotechniques* **22** 150-161.
- Paulus W, Baur I, Keyvani K & Senner V 2000 Variability of transcriptional regulation after gene transfer with the retroviral tetracycline system. *J Biotechnol* **81** 159-165.
- Pikaart MJ, Recillas-Targa F & Felsenfeld G 1998 Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.* **12** 2852-2862.
- Rose SD & MacDonald RJ 1997 Integration of tetracycline regulation into a cell-specific transcriptional enhancer. *J.Biol.Chem.* **272** 4735-4739.
- Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N & Schatz DG 1995 A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** 6522-6526.
- Stebbins MJ, Urlinger S, Byrne G, Bello B, Hillen W & Yin JC 2001 Tetracycline-inducible systems for *Drosophila*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** 10775-10780.
- Stebbins MJ & Yin JC 2001 Adaptable doxycycline-regulated gene expression systems for *Drosophila*. *Gene* **270** 103-111.

- Strathdee CA, McLeod MR & Hall JR 1999 Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* **229** 21-29.
- Theroux TL, Esbenshade TA, Peavy RD & Minneman KP 1996 Coupling efficiencies of human alpha 1-adrenergic receptor subtypes: titration of receptor density and responsiveness with inducible and repressible expression vectors. *Mol.Pharmacol.* **50** 1376-1387.
- Urlinger S, Helbl V, Guthmann J, Pook E, Grimm S & Hillen W 2000 The p65 domain from NF-kappaB is an efficient human activator in the tetracycline-regulatable gene expression system. *Gene* **247** 103-110.
- Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P, Leysen JE & Haegeman G 2001 Evaluation of the tetracycline- and ecdysone-inducible systems for expression of neurotransmitter receptors in mammalian cells. *Eur.J Neurosci.* **14** 968-976.
- Yin DX, Zhu L & Schimke RT 1996 Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal Biochem* **235** 195-201.
- Zentilin L, Qin G, Tafuro S, Dinauer MC, Baum C & Giacca M 2000 Variegation of retroviral vector gene expression in myeloid cells. *Gene Ther* **7** 153-166.

2.2.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES EXÓGENOS EN CÉLULAS DE PEZ: EVALUACIÓN DE DIFERENTES VERSIONES DEL SISTEMA DE REGULACIÓN POR TETRACICLINA

El trabajo recogido en este capítulo ha dado lugar a la siguiente publicación:

Muñoz, I., Carrillo, M., Zanuy, S., Gómez, A., 2005

Regulation of exogenous gene expression in fish cells: an evaluation of different versions of the tetracycline-regulated system

Gene (aceptado)

2.2.1- INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el número de genes de peces identificados ha aumentado considerablemente. Los proyectos de secuenciación de los genomas de pez cebra, medaka y los peces globo *Takifugu rubripes* y *Tetraodon nigroviridis*, junto con la construcción de librerías de EST (*Expressed Sequence Tags*), a partir de especies de peces comerciales y modelo, han contribuido notablemente a la identificación de genes nuevos. Para poder analizar la función de estos genes es importante disponer de sistemas que permitan el control de la expresión génica en un contexto biológico piscícola. Sin embargo, no se dispone de un sistema que permita una regulación fiable de genes exógenos en células de pez. Se han aislado promotores inducibles por metales pesados de diversas especies de peces, y se han usado para regular la expresión de ciertos transgenes eficazmente (Hong *et al.* 1993; Olsson & Kille 1997). Sin embargo, los metales son contaminantes potenciales para el medio ambiente y pueden causar efectos pleiotrópicos en los peces. Otro tipo de promotor inducible probado en peces, es el promotor del gen de la proteína de choque térmico *hsp70*. El promotor *hsp70* de tilapia se ha evaluado en la línea celular EPC procedente de epitelio de carpa (Molina *et al.* 2002), y promotores *hsp70* heterólogos se han probado en peces *in vivo* (Adam *et al.* 2000). Recientemente, el promotor *hsp70* de pez cebra se ha usado para dirigir la expresión del transactivador Gal4/Vp16 en medaka (Grabher & Wittbrodt 2004). A pesar de conseguir un nivel alto de inducción con los promotores *hsp70*, ésta se mantiene únicamente de forma transitoria, y desaparece una vez se repara el efecto del choque térmico. Además, las condiciones de estrés usadas para inducir la expresión pueden causar efectos secundarios que afecten a los procesos biológicos de las células.

De las estrategias utilizadas en otros eucariotas para regular la expresión génica, el sistema de regulación por tetraciclina desarrollado por Gossen y Bujard (Gossen & Bujard 1992) ha funcionado eficientemente en ratón (Furth *et al.* 1994), *Drosophila* (Stebbins *et al.* 2001) y en diferentes líneas celulares (Howe *et al.* 1995; Izumi & Gilbert 1999; Gopalkrishnan *et al.* 1999). El sistema consiste en dos componentes diferentes (Gossen & Bujard 1992); uno de ellos es una proteína de fusión (tTA) entre el represor TetR de *Escherichia coli* y el dominio de activación transcripcional de la

proteína VP16 del virus del herpes simple, y actúa como un transactivador. La expresión de este gen híbrido se encuentra generalmente bajo el control de un promotor constitutivo. El segundo componente contiene el gen a inducir bajo el control del promotor *tet*, que contiene el promotor mínimo del citomegalovirus (CMV), precedido de varias copias del operador de la resistencia a tetraciclina de *E. coli* (*tetO*). En ausencia de tetraciclina, o alguno de sus derivados, el transactivador tTA se une al operador y se inicia la transcripción. Sin embargo, en presencia de tetraciclina, el transactivador tTA se une al antibiótico, esto origina en él un cambio conformacional que lo inhabilita para unirse al operador e iniciar la transcripción. A este sistema se le conoce como *tet-off*. Existe otra versión del sistema, llamada *tet-on*, que se basa en una proteína de fusión (rtTA) originada mediante mutagénesis al azar del transactivador original tTA, y que es capaz de unirse a las secuencias del operador *tetO* solamente en presencia de doxiciclina (Gossen *et al.* 1995). Este sistema es especialmente útil cuando la expresión del gen de interés sólo se requiere en periodos cortos de tiempo, o cuando no es conveniente una exposición prolongada al antibiótico.

El proceso de obtención de una línea celular que contenga el sistema de regulación por tetraciclina consta de varios pasos. En primer lugar, se introduce el transactivador en la línea celular de manera estable. A continuación se debe realizar un cribado que permita seleccionar aquellos clones que expresan el transactivador de manera funcional. En un segundo paso, se introduce el plásmido que contiene el promotor *tet* que responde a tetraciclina y el gen a regular. Finalmente, se realiza un segundo cribado para encontrar un clon regulable por tetraciclina (Gossen & Bujard 1992; Gossen *et al.* 1995).

El sistema de regulación por tetraciclina se ha convertido en el más utilizado en mamíferos porque permite una regulación muy precisa, y por la nula toxicidad del inductor. Además, debido a su origen procariota no son de esperar interferencias con la maquinaria endógena. Sin embargo, se ha descrito la aparición de problemas en el establecimiento de este sistema de manera estable (Gossen & Bujard 1992; Shockett *et al.* 1995; Theroux *et al.* 1996; Gopalkrishnan *et al.* 1999). Estos problemas se deben probablemente a la toxicidad potencial del transactivador (Gossen & Bujard 1992;

Gallia & Khalili 1998), combinado con su expresión constitutiva dirigida por promotores virales como el CMV. Estos factores pueden llevar al silenciamiento de la expresión del transactivador (Shockett *et al.* 1995). Algunas alternativas propuestas para solucionar este problema son el uso de promotores más débiles (Rose & MacDonald 1997; Gopalkrishnan *et al.* 1999) y la construcción de sistemas autorregulados donde la expresión del transactivador y del gen de interés se regulen simultáneamente por tetraciclina (Shockett *et al.* 1995). Otras opciones son flanquear el transactivador con secuencias aisladoras de la cromatina, o generar un transcrito bicistrónico conteniendo el transactivador y un gen de resistencia a antibiótico (Izumi & Gilbert 1999; Qu *et al.* 2004a).

A pesar del éxito del sistema de regulación por tetraciclina en diferentes eucariotas, y de la necesidad de encontrar un método válido para el control de la expresión génica en peces, este sistema nunca se ha probado en células de pez. Para llevar a cabo esta evaluación, se han comparado diferentes versiones del sistema (*tet-off*, *tet-on* y el sistema autorregulado), y el uso de promotores de distinto origen y fuerza (el promotor viral CMV y el promotor de la actina β de carpa) en una línea celular de pez muy usada en experimentos de transferencia génica. Finalmente, hemos aplicado una estrategia que facilita la obtención de clones regulables por tetraciclina (Munoz *et al.* 2004), y hemos demostrado que este sistema es eficiente para regular la expresión de genes exógenos en líneas celulares de pez.

2.2.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Plásmidos de expresión

Los plásmidos usados en este trabajo conteniendo un transactivador con afinidad por tetraciclina son los siguientes: (i) **pTet-On** y **pTet-Off** (Clontech Labs, Palo Alto, CA), que contienen respectivamente los genes híbridos *rtTA* y *tTA* bajo el control del promotor y potenciador hCMV. (ii) **p β -actin-rtTA**, que contiene el transactivador *rtTA*, como un fragmento *NaeI-XhoI*, bajo el control del promotor de la actina β de carpa. Éste está constituido por 3.3 kb de región promotora más el primer exón no traducido y el primer intrón (fig 2.2.1A). (iii) **p β -actin-tTA**, que contiene el transactivador *tTA* bajo el control del promotor de la actina β de carpa. Para su construcción, un fragmento *EcoRI-BamHI* conteniendo *tTA* se insertó en p β -actin-rtTA sustituyendo a *rtTA* (fig 2.2.1B). (iv) **pTet-luc+-rtTA** es un vector autorregulado, *rtTA* y el gen de la luciferasa están corregulados por el promotor bidireccional sensible a tetraciclina P_{bi-1} (Baron *et al.* 1995). Para construirlo *rtTA* se insertó como un fragmento *EcoRV-SpeI* en el plásmido Tet-luc+ digerido con *PvuII-NheI* (fig 2.2.1C).

Los plásmidos usados que responden a tetraciclina fueron: (i) **pTet-luc+**, basado en el plásmido pBI-4 (Baron *et al.* 1995), que contiene un promotor bidireccional P_{bi-1} formado por 7 secuencias del operador *tetO* flanqueadas por dos promotores mínimos hCMV. Para su construcción, el gen de la luciferasa de luciérnaga (*luc+*) se insertó como un fragmento *PstI-NaeI* en los sitios *PstI* y *Sall* /Klenow de uno de los lados del promotor P_{bi-1} de pBI-4. (ii) **pTet-luc+-pur/GFP** (fig 2.2.1D) contiene un gen de fusión *pac/EGFP* (Yunhan Hong, no publicado) en uno de los lados del promotor P_{bi-1} y el gen de la luciferasa de luciérnaga (*luc+*) en el otro lado (Munoz *et al.* 2004).

pRL-CMV (Promega, Madison, WI) es un plásmido que expresa constitutivamente la luciferasa de *Renilla reniformis*. **tgCMV/HyTK** contiene un gen de resistencia a higromicina.

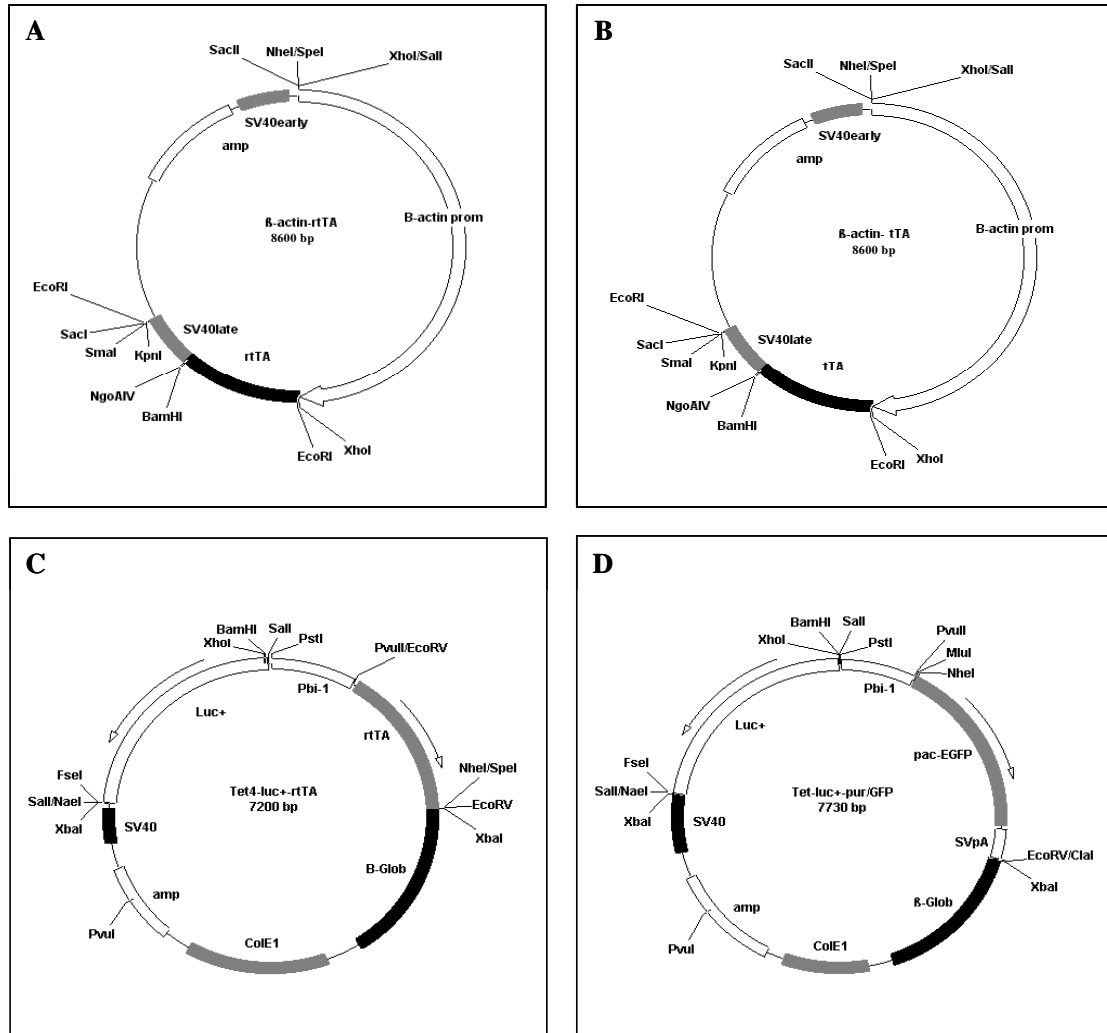


Fig 2.2.1.- Mapa esquemático de los plásmidos usados en este trabajo. SV40, SV40 *early*, SV40 *late*, SVpA y β -glob son fragmentos que contienen secuencias de poliadenilación, amp es el gen de resistencia a ampicilina. ColE1 es el origen de replicación para la propagación del plásmido en *E. coli*. **(A)** El plásmido β -actin-rtTA . El transactivador rtTA está bajo el control del promotor de la actina β de carpa. **(B)** El plásmido β -actin-tTA. El transactivador tTA está bajo el control del promotor de la actina β de carpa. **(C)** El plásmido Tet-luc+-rtTA, es un vector autorregulado, los genes de la luciferasa y el transactivador rtTA están bajo el control del promotor bidireccional que responde a tetraciclina P_{bi-1}. **(D)** El plásmido Tet-luc+-pur/GFP. El gen de la luciferasa (*luc+*) y el gen híbrido *pac/EGFP* que codifica una proteína de fusión entre la EGFP y la resistencia a puromicina están bajo el control del promotor P_{bi-1}.

Cultivos celulares y transfecciones

Las células EPC, línea procedente de un epiteloma de carpa, se mantuvieron en medio Ham's F12 (Invitrogen) enriquecido con un 10% de suero fetal bovino, L-glutamina (2mM), penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100 unidades/ml), y anfotericina B (0.25 µg/ml). Las células se transfectaron usando FuGENE (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las transfecciones transitorias se realizaron en células crecidas en placas de 24 pocillos (80% de confluencia). Las células se recogieron 72 horas después de transfectadas e inducidas, y se midió la actividad luciferasa. Para generar clones estables las células se recogieron 48 horas después de la transfección, se sembraron en placas de 96 pocillos y se seleccionaron con los antibióticos apropiados. Los clones que contienen pTet-luc⁺-rtTA o pTet-luc⁺-pur/GFP se obtuvieron por cotransfección con tgCMV/HyTK y posterior selección con higromicina (300 µg/ml). Los demás clones generados en este trabajo se seleccionaron con puromicina (8 µg/ml), para aquellos que llevaban el transactivador tTA, o con puromicina y doxiciclina (2 µg/ml) para aquellos que contenían el transactivador rtTA. Para caracterizar los clones estables se sembraron en placas de 24 o 12 pocillos. Cuando alcanzaron un 80% de confluencia, se incubaron con medio conteniendo la combinación apropiada de antibióticos (doxiciclina 2 µg/ml, hidrocloreuro de tetraciclina 2 µg/ml, puromicina 8 µg/ml) o sin antibióticos durante varios días.

Ensayo de la luciferasa y la proteína verde fluorescente

Las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS), se lisaron con *Passive Lysis Buffer* (Promega), y se recogieron de las placas. Posteriormente se eliminaron los restos celulares por centrifugación (15000 g durante 20 min). Se mezclaron 20 µl del sobrenadante con 200 µl del reactivo luciferina (20 mM TricinaKOH, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 8 mM MgCl₂, 33.3 mM DTT, 270 µM CoA, 530 µM ATP, 400 µM luciferina). La luz emitida se midió en un luminómetro (*Junior* EG&G, Berthold) y se expresó como unidades relativas de luz (RLU).

La fluorescencia debida a la GFP se midió a partir de 300 µl de sobrenadante con un espectrofotómetro de fluorescencia (F-2500, Hitachi). Las longitudes de onda de

excitación y emisión fueron 485 y 508 nm, respectivamente. La expresión de GFP se monitorizó en las células en cultivo mediante un microscopio de fluorescencia (Olympus IX71). La cantidad de proteína se determinó utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad) y utilizando albúmina de suero bovina (Sigma) como patrón.

2.2.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Control mediante tetraciclina de la expresión transitoria de genes en células de pez

Se llevó a cabo un análisis preliminar del funcionamiento del sistema de regulación por tetraciclina en células de pez mediante transfecciones transitorias en la línea celular EPC. El plásmido pTet-luc⁺ que responde a tetraciclina se cotransfectó con los plásmidos pTet-Off o pTet-On que contienen transactivadores diferentes. Cuando se usó el sistema *tet-off*, la actividad luciferasa aumentó doce veces en condiciones de inducción (fig 2.2.2A). Cuando se usó el sistema *tet-on*, la inducción conseguida fue de sólo seis veces (fig 2.2.2B). A pesar de que los niveles absolutos de actividad luciferasa conseguidos con la inducción son mayores que los obtenidos con el sistema *tet-off*, el sistema *tet-on* presenta una regulación menor. Esto se debe a que el nivel basal de expresión luciferasa es muy alto en condiciones de no inducción. La persistencia de la expresión de luciferasa en el sistema *tet-on* no inducido, se debe probablemente a la unión residual de rtTA a *tetO* en ausencia del inductor (Urlinger *et al.* 2000a), y está en la misma línea que lo observado en otros trabajos realizados en mamíferos con este sistema (Rizzuto *et al.* 1999; Urlinger *et al.* 2000b).

Expresión de rtTA bajo el control de distintos promotores. Ensayo en condiciones transitorias

Para conseguir regular el sistema *tet-on* de una manera más precisa, se debía disminuir la actividad luciferasa que aparecía en condiciones no inducidas. Una estrategia para conseguirlo consistía en reducir la cantidad de transactivador en

condiciones silenciadas, para ello se construyó el vector autorregulado Tet-luc⁺-rtTA (fig. 2.2.1C). En este plásmido, tanto el gen que codifica rtTA como el gen de la luciferasa se encuentran bajo el control del promotor bidireccional P_{bi-1}, capaz de responder a tetraciclina. Con ello, la expresión de rtTA y luciferasa debe mantenerse silenciada hasta el momento de la inducción. Cuando se añade el inductor, las moléculas del transactivador resultantes de la expresión basal del promotor se unirán a *tetO*, iniciándose un bucle de retroalimentación positiva hasta que se elimine el inductor. Se realizaron transfecciones transitorias en células EPC con el plásmido Tet-luc⁺-rtTA. Como resultado la actividad luciferasa en condiciones de no inducción disminuyó hasta 11 veces con respecto al sistema *tet-on* original, y en consecuencia, se obtuvo un incremento de la actividad luciferasa de más de 20 veces en condiciones de inducción (fig 2.2.2D).

Otra alternativa, para conseguir una baja expresión de rtTA, era utilizar un promotor más débil que CMV para dirigir su expresión. Se eligió el promotor del gen de la actina β de carpa, pues habíamos observado que éste promovía niveles bajos de expresión de otros genes en esta misma línea celular (resultados no mostrados). Así, se construyó un plásmido que contenía el gen *rtTA* bajo el control del promotor de la actina β de carpa, éste se cotransfectó de manera transitoria con el plásmido pTet-luc⁺ en células EPC. Aunque el nivel basal de luciferasa en condiciones de no inducción disminuyó 12 veces respecto al sistema *tet-on* original, sólo se consiguió una inducción de tres veces (fig 2.2.2C). Por lo tanto, el uso del plásmido Tet-luc⁺-rtTA, parecía la aproximación más óptima para obtener clones estables conteniendo el sistema *tet-on*.

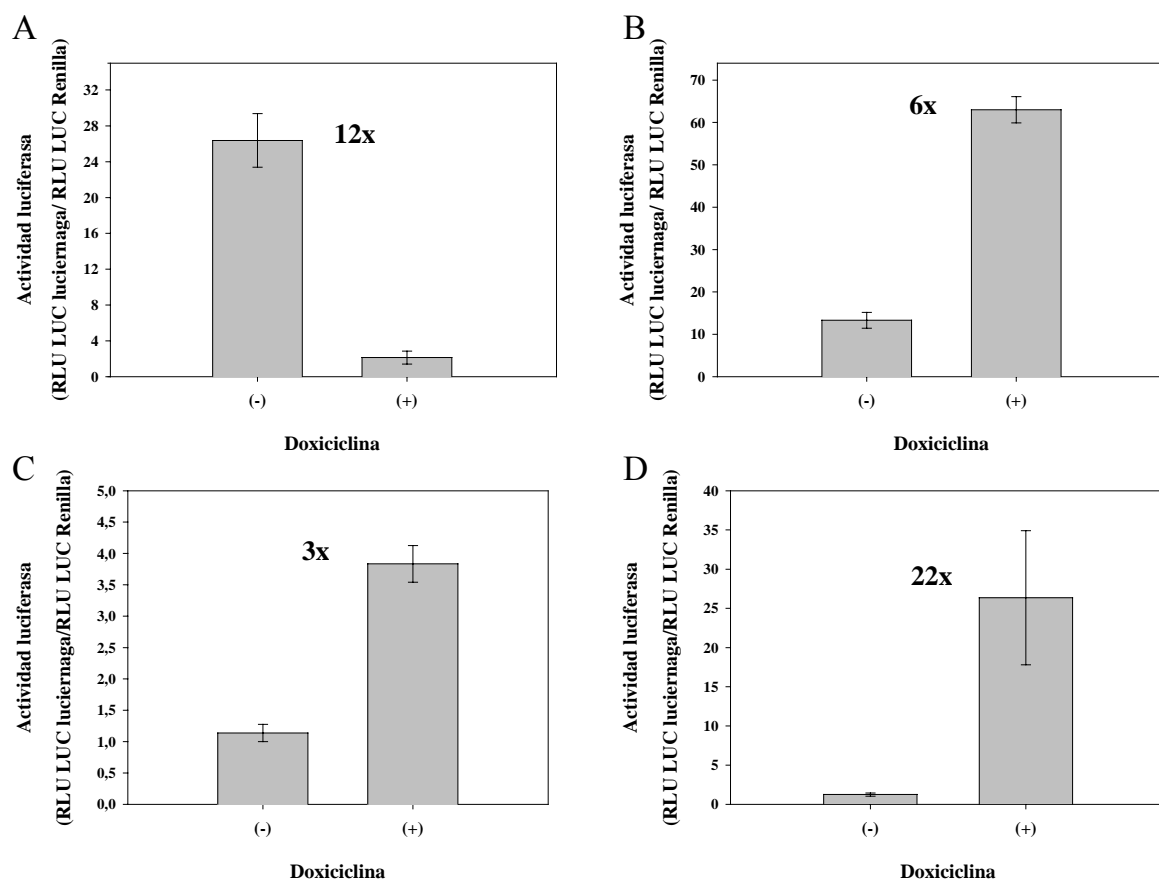


Fig 2.2.2.- Comparación de diferentes versiones del sistema de regulación por tetraciclina en células EPC. **(A, B y C)** Las células se transfectaron con el plásmido que responde a tetraciclina pTet-luc+ (0.0875 μ g), con pRL-CMV (0.021 μ g) como control interno de la transfección y los siguientes transactivadores **(A)** pTet-Off (0.0875 μ g), **(B)** pTet-On (0.0875 μ g) y **(C)** p β -actin-rtTA (0.0875 μ g). **(D)** Las células se transfectaron con pRL-CMV (0.021 μ g) como control interno de la transfección y pTet-luc+-rtTA (0.179 μ g). Después de la transfección, las células se mantuvieron en ausencia (-) o en presencia (+) de doxiciclina durante 48 horas. La actividad luciferasa relativa se calculó como el cociente entre las RLUs de la luciferasa de luciernaga y las RLUs de la luciferasa de *Renilla reniformis*. Cada barra representa la media de cinco duplicados. El grado de regulación alcanzado en cada caso, se indica en la parte superior.

Establecimiento, análisis y comparación de distintas versiones del sistema de regulación por tetraciclina expresados de manera estable en una línea celular de pez

Los experimentos descritos anteriormente sirvieron para evaluar el funcionamiento de distintos sistemas de regulación por tetraciclina en células de pez transfectadas de forma transitoria. Sin embargo, cuando el sistema funciona de manera estable, se obtiene un grado de regulación mayor. Para comprobar si los sistemas estudiados de forma transitoria retenían su funcionalidad al integrarse en el genoma celular, y para saber cual de ellos era el más óptimo, se generaron diferentes clones a partir de células EPC. En condiciones transitorias, el vector autorregulado Tet-luc+rtTA había sido el más eficiente, en cuanto al bajo nivel de expresión basal obtenido y la gran inducción alcanzada; por lo que se generaron clones estables conteniendo este plásmido. Tras seleccionar con higromicina, se aislaron 150 clones, y se analizó la expresión de luciferasa que se obtenía al crecerlos en presencia o ausencia de doxiciclina en el medio. Noventa y cinco de estos clones mostraron tan solo un nivel basal de actividad luciferasa, tanto con doxiciclina como sin ella, similar al de células sin transfectar. Este sistema se basa en la expresión mínima de transactivador que escapa al control del promotor en estado no inducido. Por lo tanto, este resultado podría explicarse por un silenciamiento absoluto del promotor P_{bi-1} , que impedía la iniciación del bucle de autorregulación. Incluso produciéndose niveles basales del transactivador, se han descrito determinantes funcionales que pueden explicar el fallo del sistema en estos clones. Se ha demostrado, que cuando hay una concentración baja del transactivador, el estado de acetilación de la cromatina alrededor del promotor *tet* influye decisivamente en la capacidad de unión de éste con el transactivador, llegando a no producirse (Boger & Gruss 1999).

En 35 de los clones se obtuvo un nivel mucho más alto de la expresión de luciferasa (10-100 veces), pero no se vio que hubiese regulación de la expresión en presencia-ausencia de doxiciclina. Esta expresión constitutiva indicaba que el gen de la luciferasa estaba situado bajo la influencia de otro promotor. Una explicación posible para este comportamiento es que el promotor de la resistencia a higromicina

cotransfectada fuera el que realmente dirige la expresión de la luciferasa (Ishikawa *et al.* 2004). Sólo un clon mostraba una regulación de 10 veces, lo cual es un nivel de regulación mucho menor del que cabría esperar. Por tanto, estos resultados demuestran que la eficiencia del sistema está muy influenciada por su sitio de integración en el genoma. La variabilidad de la expresión entre clones, dependiendo del sitio de integración de los componentes del sistema de tetraciclina, se ha descrito en muchas ocasiones (Gossen & Bujard 1992; Howe *et al.* 1995; Gossen *et al.* 1995; Theroux *et al.* 1996; Yin *et al.* 1996; Baron & Bujard 2000). Como consecuencia, es necesario analizar un número muy alto de clones antes de encontrar uno con una regulación eficiente; incluso se han descrito casos donde el sistema no ha podido establecerse (Gopalkrishnan *et al.* 1999; Callus & Mathey-Prevot 1999; Akagi *et al.* 2001; Rennel & Gerwins 2002). Finalmente, podemos decir que esta aproximación no es útil para la obtención de clones estables conteniendo el sistema de regulación por tetraciclina en células de pez.

El procedimiento clásico para la obtención de clones regulables por tetraciclina consiste en, primero establecer una línea celular que exprese el transactivador, y a continuación introducir el plásmido que responde a tetraciclina. En nuestro caso, para poder comparar los dos tipos de transactivador (tTA y rtTA) y los dos tipos de promotor dirigiendo su expresión (CMV y actina β de carpa), necesitábamos que el plásmido que responde a tetraciclina estuviese integrado en el mismo punto del genoma celular en todos los casos. Por ello, se procedió a crear inicialmente una línea estable conteniendo el plásmido regulable por tetraciclina pTet-luc⁺-pur/GFP, que había sido de gran utilidad para la identificación de clones con el sistema de regulación por tetraciclina, ver 2.1 (Munoz *et al.* 2004). Se eligieron aquellos clones que no mostraban expresión de GFP, como indicación de un nivel bajo de expresión basal. Después, se cuantificó el nivel de actividad luciferasa. Se seleccionó el clon que presentaba un menor nivel de actividad luciferasa, el cual era muy cercano al de las células sin transfectar. Esto indicaba que el promotor sensible a tetraciclina estaba integrado en un sitio sin influencia de ningún otro elemento regulador. Sobre este clon se realizó una segunda transfección con los plásmidos pTet-Off, pTet-On, β -actin-tTA

o β -actin-rtTA, para posteriormente seleccionar clones estables. Con el fin de comprobar que pTet-luc⁺-pur/GFP se encontraba en un sitio del genoma transcripcionalmente activo, se reservaron algunos de estos pocillos para su análisis de forma transitoria. Se encontró que tras transfectar con pTet-Off, pTet-On, β -actin-tTA y β -actin-rtTA se conseguía, en condiciones de inducción, un aumento de actividad luciferasa de 22, 7, 11 y 2,6 veces respectivamente (tabla 2.2.1). El resto de células se mantuvieron en condiciones de inducción y bajo selección con puromicina hasta la obtención de clones estables. Aunque se transfectó el mismo número de células con cada transactivador, se obtuvo un número mayor de clones resistentes a la puromicina con tTA (tabla 2.2.2). Por otro lado, todos los clones que contenían el transactivador bajo el control del promotor CMV mostraron expresión de la GFP tras un mes de selección, mientras que dos tercios de los clones que contenían el promotor de la actina β de carpa, dirigiendo la expresión del transactivador, habían perdido la capacidad de producir GFP en condiciones de inducción.

Para poder analizar la regulación de las líneas estables, varios clones de cada transfección se cultivaron durante varios días sin puromicina, en presencia o ausencia de doxiciclina; y se estudió la expresión de luciferasa y GFP. La tabla 2.2.2, muestra que el sistema *tet-off* dió los mejores resultados. Se obtuvieron muchos clones, y en un porcentaje alto (66%) de los analizados, se podía regular la expresión de los dos genes indicadores. El sistema *tet-on* fue menos eficiente. Se aislaron cinco clones y sólo uno de ellos mostraba un grado óptimo de regulación; sin embargo, su crecimiento era extremadamente lento comparado con las células sin transfectar.

Cuando se usó el promotor de la actina β de carpa, se obtuvo un número alto de clones que expresaban GFP con diferentes intensidades (tabla 2.2.2). Sin embargo, un alto porcentaje de los mismos perdió la capacidad de expresar GFP durante los pases. Además, la observación de la GFP nos permitió detectar una gran variabilidad intraclonal en estos clones. Bajo condiciones de inducción, se podían observar, dentro de un mismo clón, células con intensidades muy diferentes de fluorescencia, o incluso células que no expresaban la GFP en condiciones inducidas.

Al comparar los transactivadores rtTA y tTA (tabla 2.2.2), los mejores resultados se obtuvieron con este último, tanto en el número total de clones obtenidos como en el número de clones regulables. Esto indicaría que tTA es menos tóxico para las células que rtTA y por tanto, se obtienen clones estables más fácilmente con este sistema. Este hecho se ha observado en otros organismos como *Drosophila* (Bello *et al.* 1998), y ciertos tipos celulares de ratón (Urlinger *et al.* 2000a). Por otro lado el promotor CMV mostró mejores resultados que el promotor de la actina β de carpa. Diferentes trabajos describen la dificultad de obtener clones estables cuando el transactivador está bajo el control del promotor constitutivo CMV (Gopalkrishnan *et al.* 1999; Anastassiadis *et al.* 2002), debido a la extinción de la actividad del promotor. En nuestro caso, el elevado número de clones positivos obtenidos es probablemente debido a la alta eficiencia del método de cribado haciendo uso del plásmido pTet-luc+-pur/GFP. La obtención de un 66% de clones positivos con la combinación CMV-tTA es claramente superior a la obtenida por otros autores (10% (Anastassiadis *et al.* 2002), 20% (Chambard & Pognonec 1998), 32% (Theroux *et al.* 1996), 18% (Shockett *et al.* 1995), 0% (Gopalkrishnan *et al.*, 1999)). En consecuencia, el número de clones analizados hasta encontrar uno con una regulación eficiente fue menor que el necesitado en otros trabajos.

TABLA 2.2.1.- Actividad luciferasa en células EPC conteniendo pTet-luc+-pur/GFP y transfectadas de forma transitoria con diferentes transactivadores

Plásmidos	RLU ^a		Grado de regulación ^d
	Dox (+) ^b	Dox (-) ^c	
pTet-Off	380 ± 30	8285 ± 445	22x
pβ-actin-tTA	412 ± 17	4385 ± 135	11x
pTet-On	12700 ± 700	1940 ± 180	7x
pβ-actin-rtTA	8466 ± 352	3200 ± 700	2.6x

^a RLU (Relative Light Units), actividad relativa luciferasa como se describe en la sección 2.2.3

^b Presencia de doxiciclina (2 µg/ml)

^c Ausencia de doxiciclina (2 µg/ml)

^d RLU en condiciones de inducción/RLU en condiciones de no inducción

TABLA 2.2.2.- Caracterización de clones estables EPC conteniendo diferentes transactivadores y pTet-luc+-pur/GFP.

Plásmidos	Total clones	Expresión de GFP tras un mes de selección ^a	Clones analizados	Sin regulación en GFP y LUC ^a	Sólo regulación en GFP ^a	Regulación en GFP y LUC ^a
pTet-Off	200	190 (95%)	30	8	2	20 (66%)
pβ-actin-tTA	85	32 (37%)	16	10	1	5 (31%)
pTet-On	5	5 (100%)	5	4		1 (25%)
pβ-actin-rtTA	41	13 (31,7%)	13	12		1 (7,6%)

^a Número de clones

Inestabilidad del promotor de la actina β de carpa dirigiendo la expresión del transactivador rtTA

Como se ha descrito anteriormente, la observación de GFP reveló que el uso del promotor de la actina β de carpa, para dirigir la expresión del transactivador, generaba mayor variabilidad intraclonal que el promotor CMV. Para investigar este aspecto, se realizó un análisis más profundo de los clones que contenían p β -actin-rtTA y conservaban la expresión de GFP. Los clones se mantuvieron en tres condiciones diferentes: sólo con medio de cultivo (no inducción), medio con doxiciclina (inducción), y medio con doxiciclina y puromicina (inducción y selección). Cuatro días más tarde, se midió la actividad luciferasa y se pudieron distinguir tres comportamientos diferentes en estos clones (fig 2.2.3). La mayoría de ellos no se inducían con doxiciclina o doxiciclina más puromicina. Algunos de ellos se inducían sólo en presencia de puromicina más doxiciclina. Solamente el clon 2, mostraba un nivel modesto de regulación (10-veces) en presencia de doxiciclina; sin embargo mostraba una regulación mucho mejor (550-veces) en presencia de doxiciclina más puromicina. Tanto este clon como el resto de clones presentaban una gran variabilidad intraclonal en la expresión de la GFP (datos no mostrados). Se observó que las células que no expresaban GFP morían cuando se añadía puromicina y doxiciclina; lo que indicaba que el sistema había dejado de ser funcional en estas células. Además, la tasa de crecimiento era mucho mayor cuando las células no estaban sometidas a presión de selección. En concordancia con nuestras observaciones, se ha descrito que las células que pierden la expresión del transactivador adquieren una ventaja selectiva respecto a las células que lo mantienen funcional (Qu *et al.* 2004b), por tanto, la actividad del transactivador está inversamente relacionada con la tasa de crecimiento de las células (Gallia & Khalili 1998; Izumi & Gilbert 1999).

La decisión de probar el promotor de la actina β de carpa para dirigir la expresión del transactivador se basó en su procedencia de pez, y en el hecho de haberse comportado como un promotor más débil que el de CMV para dirigir la expresión de otros genes en la línea celular EPC (resultados no mostrados). En principio, esto debería suponer una cantidad menor de transactivador por célula, lo que evitaría

problemas de toxicidad. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la expresión de rtTA dirigida por el promotor de la actina β de carpa es muy inestable. En consecuencia, sólo mediante selección con antibióticos se puede mantener el sistema en la línea celular. Por el contrario, el uso de un promotor más fuerte (CMV) para dirigir la expresión del transactivador producía una expresión más homogénea y estable, sin la necesidad de una presión de selección continua. Como en el caso del sistema autorregulado, la pérdida de expresión en los clones con el promotor de la actina β de carpa podría relacionarse con la cantidad de transactivador. Varios artículos sugieren que concentraciones altas del transactivador son tóxicas para las células (Gossen & Bujard 1992; Gallia & Khalili 1998). Sin embargo, se ha demostrado que cuando la cantidad de transactivador por célula es muy baja, el estado de hiperacetilación de las histonas alrededor del promotor diana es un factor decisivo para la funcionalidad del transactivador. Por el contrario, una cantidad de transactivador alta puede compensar un estado no idóneo de acetilación de las histonas, resultando en una expresión más homogénea (Boger & Gruss 1999).

La inestabilidad podría deberse también a la propia secuencia del promotor de la actina β de carpa. No obstante, no hemos encontrado descripción alguna de un comportamiento similar del promotor de la actina β de carpa. En la mayoría de los artículos donde se ha ensayado este promotor, se ha utilizado una secuencia reguladora que comprende como máximo 1.1 kb del extremo 5'; sin embargo, la construcción utilizada en este trabajo contiene 3.3 kb del extremo 5', las cuales incluyen elementos reguladores adicionales. Esta diferencia no debería influir en el nivel de expresión del gen, ya que el primer exón no traducido y el intrón I están incluidos también en ambos casos (Liu *et al.* 1990). Por otra parte, el uso de este mismo fragmento del promotor ha dado lugar a un patrón desigual en la expresión del gen *lacZ* en tilapia transgénica (Rahman *et al.* 2000). Los autores concluyeron que esto era debido a la metilación observada dentro de las secuencias reguladoras del promotor de la actina β de carpa, y que la causa de esta metilación podía ser la alta densidad de secuencias CpG en el gen *lacZ* (Chevalier-Mariette *et al.* 2003). Por tanto, la combinación de estas secuencias reguladoras con el transactivador podrían haber silenciado la expresión génica a través

de la metilación. Por otra parte, la menor efectividad de la construcción p β -actin-rtTA, comparada con p β -actin-tTA, es coherente con otros resultados obtenidos al comparar los transactivadores tTA y rtTA, tanto por otros autores, como por nosotros con el promotor CMV.

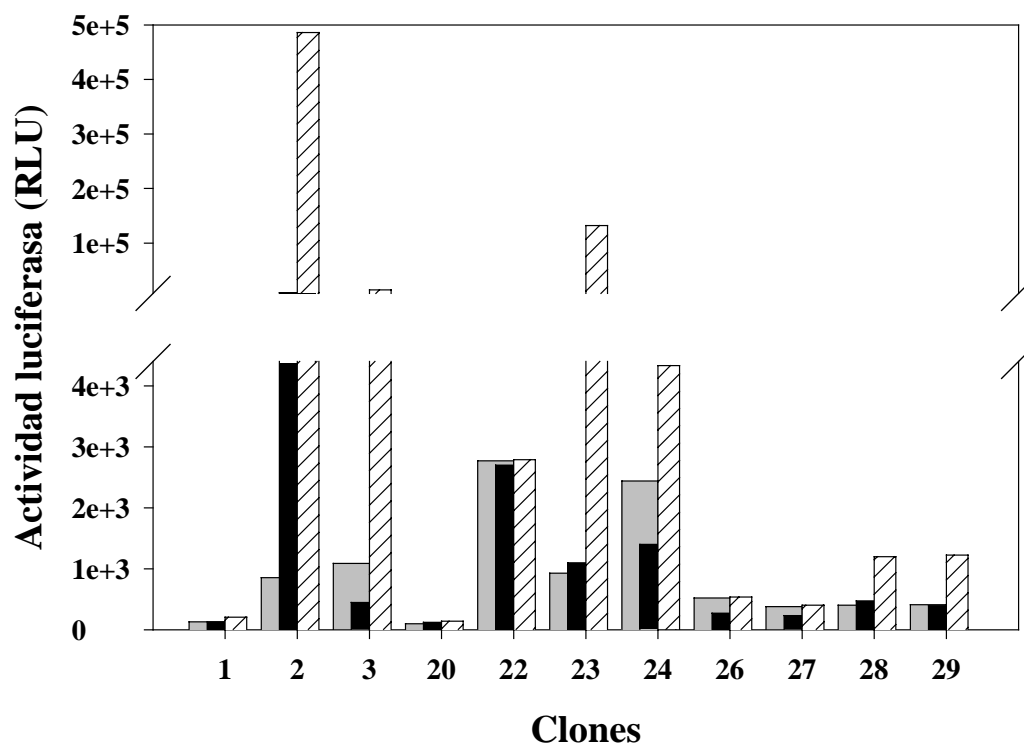


Fig 2.2.3.- Actividad luciferasa en clones conteniendo p β -actin-rtTA y pTet-luc+pur/GFP. Cada clon se mantuvo en tres condiciones diferentes: no inducido en medio de cultivo únicamente (barras grises), inducido en medio de cultivo con doxiciclina (2 μ g/ml) (barras negras) e inducido con presión de selección en medio de cultivo con doxiciclina (2 μ g/ml) y puromicina (8 μ g/ml) (barras rayadas). Cuatro días más tarde, se midió la actividad luciferasa y se expresó como RLU.

Cinética de la expresión de los sistemas *tet-off* y *tet-on*

Unas de las características más importantes a considerar en estos sistemas es su estabilidad a través de varios ciclos de inducción/represión, y el tiempo requerido para activar o reprimir la expresión de los genes. Para determinar las propiedades de las líneas estables *tet-off*, se eligieron dos clones, 9-tTA y 25-tTA, que contenían pTet-Off y pTet-luc⁺-pur/GFP, y se estudió la expresión a lo largo del tiempo. Para silenciar la expresión de los genes analizados, se añadió tetraciclina a los clones activados (fig 2.2.4A y 2.2.4C). La actividad luciferasa y la fluorescencia de la GFP disminuyeron considerablemente durante las primeras horas. Se consiguió una represión total tras 96 horas para el clon 25-tTA (fig 2.2.4A) y 120 horas para el clon 9-tTA (fig 2.2.4C). Ambas proteínas indicadoras seguían una cinética muy similar. Para estudiar la cinética de activación estos clones se silenciaron primero durante 10 días con tetraciclina. A continuación se incubaron en medio sin antibiótico (figs 2.2.4B y 2.2.4D). Ambos clones recuperaron los niveles iniciales de expresión de luciferasa y de GFP a las 144 horas. La fluorescencia debida a la GFP en el clon 9-tTA, bajo condiciones de inducción y no inducción, puede verse en la figura 2.2.5. Se comprobó que estos clones conservaban las mismas propiedades tras varias rondas de congelación/descongelación. Para conseguir una represión o inducción completa, se mantuvieron, durante nueve días, células de estos clones en medio con o sin tetraciclina. En estas condiciones, el factor de regulación alcanzado por la luciferasa fue de 68 veces para el clon 25-tTA y de 94 veces para el clon 9-tTA. El clon 9-tTA mostraba una actividad luciferasa máxima 10 veces mayor que el clon 25-tTA (como media 27000 RLU/ μ g proteína vs 2000 RLU/ μ g proteína). En condiciones de no inducción el nivel de actividad luciferasa del clon 25-tTA (30 RLU/ μ g proteína) era similar al que mostraban las células sin transfectar, mientras que el clon 9-tTA mostraba una actividad mayor (289 RLU/ μ g proteína).

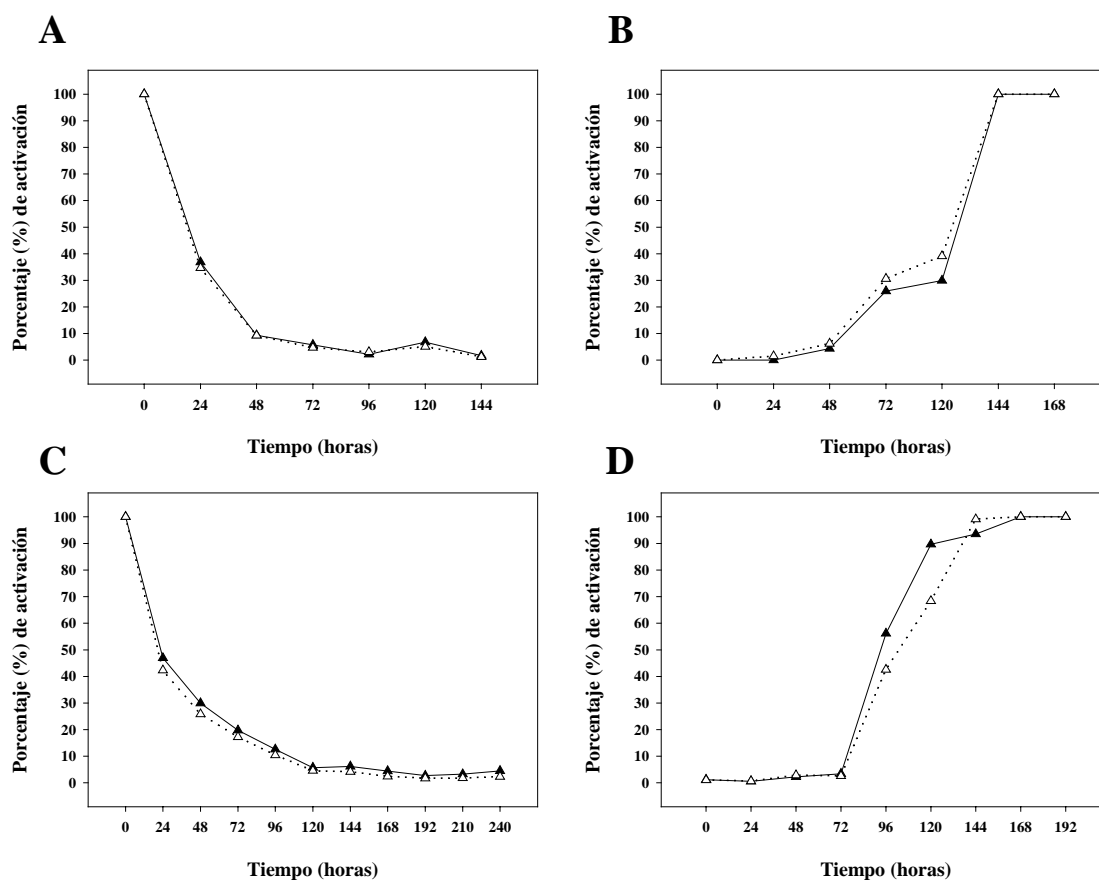


Fig 2.2.4.- Análisis de la cinética de expresión de los clones 9-tTA (**A y B**) y 11-tTA (**C y D**) conteniendo el sistema *tet-off*. (**A y C**) Cinética de represión. El clon 9-tTA (**A**) y el clon 25-tTA (**C**) se cultivaron previamente en ausencia de tetraciclina para alcanzar el máximo de expresión de luciferasa y GFP. A tiempo 0 los clones se cambiaron a un medio con 2 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina o sin antibiótico (controles inducidos). Los antibióticos y el medio de cultivo se cambiaron cada día. (**B y D**) Cinética de la inducción. Después de una represión completa del sistema, células del clon 9-tTA (**B**) y del clon 25-tTA (**D**) se recogieron, se lavaron con PBS y se sembraron en medio sin antibiótico. Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se midió la actividad luciferasa (triángulos cerrados) y la GFP (triángulos abiertos). El porcentaje de activación se calculó en cada punto como el cociente entre la actividad luciferasa (triángulos cerrados) o la fluorescencia de la GFP (triángulos abiertos) de las células tratadas y los controles inducidos.

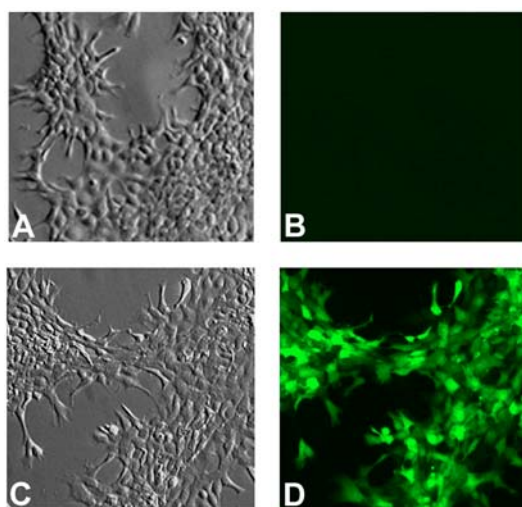


Fig 2.2.5.- Clon 9-tTA cultivado en presencia (A y B) o ausencia (C y D) de tetraciclina. (A y C) Observaciones microscópicas bajo luz blanca. (B y D) Microscopia de fluorescencia para observar la presencia de GFP.

En cuanto al sistema *tet-on*, sólo un clon, 3-rtTA, que expresara GFP sobrevivió a la selección. A pesar de que su crecimiento era extremadamente lento, pudimos analizar su cinética de expresión, y probar que la luciferasa y la GFP podían regularse por doxiciclina. Después de 10 días sin doxiciclina en el medio se alcanzó una represión máxima (fig 2.2.6A). Tras la adición de doxiciclina, la actividad luciferasa máxima se recuperó en 72 h (fig 2.2.6B). El grado de inducción alcanzado en la expresión de luciferasa fue de 38 veces, aunque el nivel basal de expresión era relativamente alto (950 RLU/ μ g proteína). En cuanto a la expresión de GFP, encontramos un alto grado de regulación (350 veces), debido al bajo nivel de su expresión basal.

Al comparar la cinética de estos dos sistemas, se observó que la cinética de represión del sistema *tet-on* era más lenta que la del sistema *tet-off*, mientras que la inducción de los genes se conseguía mucho más rápido con el sistema *tet-on*. Estas diferencias pueden deberse a la presencia de tetraciclina residual en el interior de las células *tet-off* reprimidas, o doxiciclina en las células *tet-on* inducidas, y al tiempo necesario para su desaparición durante la inducción del sistema *tet-off* o la represión del sistema *tet-on*.

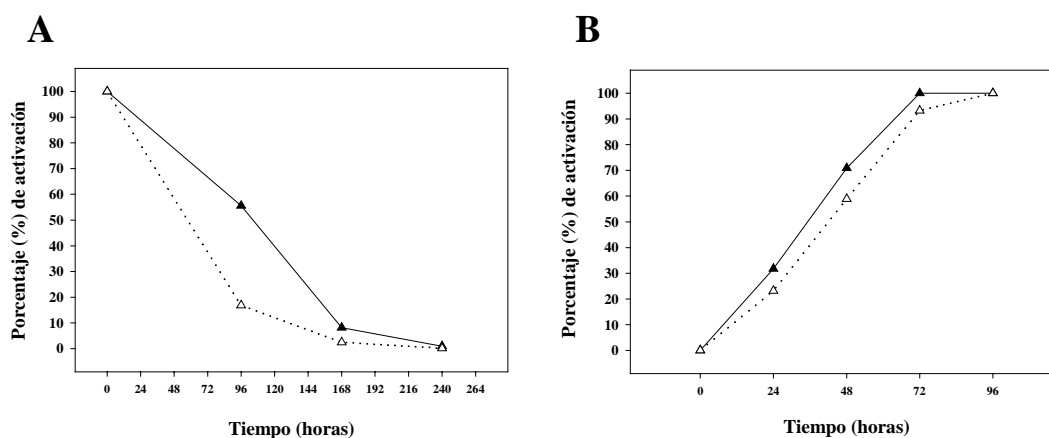


Fig 2.2.6.- Análisis de la cinética de expresión del clon 3-rtTA, que contiene el sistema *tet-on* (A) Cinética de represión. El clon 3-rtTA se cultivó primero en presencia de doxiciclina para alcanzar el máximo de expresión de luciferasa y GFP. A tiempo 0 se lavaron las células con PBS y se cambiaron a medio de cultivo sin antibiótico, o con 2 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina (controles inducidos). El medio se cambió cada día y se utilizaron antibióticos recién preparados. (B) Cinética de la inducción. Después de una represión completa del sistema, se recogieron células del clon 3-rtTA, se lavaron con PBS y se sembraron en medio con 2 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina. Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se midió la actividad luciferasa (triángulos cerrados) y la GFP (triángulos abiertos). El porcentaje de activación se calculó en cada punto como el cociente entre la actividad luciferasa (triángulos cerrados) o la fluorescencia de la GFP (triángulos abiertos) de las células tratadas y los controles inducidos.

2.2.4.- CONCLUSIONES

El sistema de regulación por tetraciclina no se había probado en células de pez anteriormente. Con el presente trabajo hemos demostrado que este sistema es apropiado para la regulación de genes exógenos en líneas celulares de pez. A diferencia del promotor de la metalotionina o de *hsp70*, con este sistema la inducción o represión puede mantenerse durante periodos largos sin que aparezcan efectos secundarios en las células. En condiciones transitorias, el uso de un plásmido autorregulado, donde la expresión del transactivador está también regulada por tetraciclina, resultó la aproximación más eficiente, con un nivel alto de inducción y una expresión basal muy reducida en ausencia del inductor. Aunque en células de mamífero esta aproximación fue también eficiente al expresarlo de manera estable (Shockett *et al.* 1995; Strathdee *et al.* 1999), en células de pez este sistema no funcionó una vez integrado en el genoma.

Se probaron dos promotores, CMV y el de la actina β de carpa, para dirigir la expresión del transactivador. El uso de CMV resultó más eficiente independientemente del transactivador utilizado, ya que el sistema se mantenía estable en los clones generados, y se podía activar o reprimir de una manera consistente la expresión de los genes indicadores. Por el contrario, en los clones conteniendo el promotor de la actina β de carpa, el sistema era muy inestable, y la capacidad de regulación de los genes indicadores se perdía con el tiempo.

Al comparar los dos transactivadores, tTA y rtTA, se obtuvo un número mucho mayor de clones con tTA, indicando que esta molécula es menos tóxica y las células de pez la toleran más fácilmente que rtTA. Además, el porcentaje de clones tTA regulables también resultó mayor que el obtenido con rtTA. Este resultado es coherente con las observaciones hechas por otros autores (Bello *et al.* 1998; Urlinger *et al.* 2000a). Probablemente, la inestabilidad, particularmente de la parte procariota del RNA mensajero de rtTA, contribuyan a este hecho. Por el contrario, no encontramos una diferencia tan destacable, entre los sistemas *tet-off* y *tet-on*, al usar una línea

celular de mamíferos (ver 2.1) (Munoz *et al.* 2004). Finalmente, el uso del plásmido pTet-luc⁺-pur/GFP ha sido esencial para poder aislar clones EPC regulables. Como ya se describe en el subcapítulo 2.1 con una línea celular de mamíferos, la posibilidad de seleccionar aquellos clones donde el sistema de regulación por tetraciclina es funcional ahorra mucho tiempo en el proceso de cribado.

En resumen, el uso del transactivador tTA, bajo el control de un promotor adecuado y estable, es la mejor opción para establecer el sistema de regulación por tetraciclina en células de pez. El uso del promotor CMV para dirigir la expresión de tTA permitió la generación de clones con un nivel de expresión basal similar a las células sin transfectar, un grado alto de inducción y una alta estabilidad a lo largo del tiempo. Después de una represión total, estos clones pueden inducirse de nuevo, alcanzando el mismo nivel de activación inicial. Por último, es destacable la gran estabilidad del sistema de regulación por tetraciclina en estos clones, ya que se mantuvieron sin presión de selección por puromicina durante todos los experimentos.

Bibliografía

- Adam A, Bartfai R, Lele Z, Krone PH & Orban L 2000 Heat-inducible expression of a reporter gene detected by transient assay in zebrafish. *Exp.Cell Res.* **256** 282-290.
- Akagi K, Kanai M, Saya H, Kozu T & Berns A 2001 A novel tetracycline-dependent transactivator with E2F4 transcriptional activation domain. *Nucleic Acids Res.* **29** E23.
- Anastassiadis K, Kim J, Daigle N, Sprengel R, Scholer HR & Stewart AF 2002 A predictable ligand regulated expression strategy for stably integrated transgenes in mammalian cells in culture. *Gene* **298** 159-172.
- Baron U & Bujard H 2000 Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol.* **327** 401-421.
- Baron U, Freundlieb S, Gossen M & Bujard H 1995 Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* **23** 3605-3606.
- Bello B, Resendez-Perez D & Gehring WJ 1998 Spatial and temporal targeting of gene expression in *Drosophila* by means of a tetracycline-dependent transactivator system. *Development* **125** 2193-2202.
- Boger H & Gruss P 1999 Functional determinants for the tetracycline-dependent transactivator tTA in transgenic mouse embryos. *Mechanisms of Development* **83** 141-153.

- Callus BA & Mathey-Prevot B 1999 Rapid selection of tetracycline-controlled inducible cell lines using a green fluorescent-transactivator fusion protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **257** 874-878.
- Chambard JC & Pognonec P 1998 A reliable way of obtaining stable inducible clones. *Nucleic Acids Res* **26** 3443-3444.
- Chevalier-Mariette C, Henry I, Montfort L, Capgras S, Forlani S, Muschler J & Nicolas JF 2003 CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes. *Genome Biology* **4**.
- Furth PA, St Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H & Hennighausen L 1994 Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **91** 9302-9306.
- Gallia GL & Khalili K 1998 Evaluation of an autoregulatory tetracycline regulated system. *Oncogene* **16** 1879-1884.
- Gopalkrishnan RV, Christiansen KA, Goldstein NI, DePinho RA & Fisher PB 1999 Use of the human EF-1alpha promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **27** 4775-4782.
- Gossen M & Bujard H 1992 Tight Control of Gene-Expression in Mammalian-Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** 5547-5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W & Bujard H 1995 Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268** 1766-1769.
- Grabher C & Wittbrodt J 2004 Efficient activation of gene expression using a heat-shock inducible Gal4/Vp16-UAS system in medaka. *Bmc Biotechnology* **4**.
- Hong YH, Winkler C, Brem G & Scharfl M 1993 Development of A Heavy Metal-Inducible Fish-Specific Expression Vector for Gene-Transfer Invitro and Invivo. *Aquaculture* **111** 215-226.
- Howe JR, Skryabin BV, Belcher SM, Zerillo CA & Schmauss C 1995 The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J.Biol.Chem.* **270** 14168-14174.
- Ishikawa T, Lee EJ & Jameson JL 2004 Nonhomologous end-joining ligation transfers DNA regulatory elements between cointroduced plasmids. *Molecular and Cellular Biology* **24** 8323-8331.
- Izumi M & Gilbert DM 1999 Homogeneous tetracycline-regulatable gene expression in mammalian fibroblasts. *J Cell Biochem* **76** 280-289.
- Liu ZJ, Moav B, Faras AJ, Guise KS, Kapuscinski AR & Hackett PB 1990 Functional-Analysis of Elements Affecting Expression of the Beta-Actin Gene of Carp. *Molecular and Cellular Biology* **10** 3432-3440.
- Molina A, Carpeaux R, Martial JA & Muller M 2002 A transformed fish cell line expressing a green fluorescent protein-luciferase fusion gene responding to cellular stress. *Toxicol.In Vitro* **16** 201-207.

- Munoz I, Gomez A, Zanuy S & Carrillo M 2004 A one-step approach to obtain cell clones expressing tetracycline-responsive transactivators. *Anal.Biochem.* **331** 153-160.
- Olsson PE & Kille P 1997 Functional comparison of the metal-regulated transcriptional control regions of metallothionein genes from cadmium-sensitive and tolerant fish species. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1350** 325-334.
- Qu Z, Thottassery JV, Van Ginkel S, Manuvakhova M, Westbrook L, Roland-Lazenby C, Hays S & Kern FG 2004a Homogeneity and long-term stability of tetracycline-regulated gene expression with low basal activity by using the rtTA2S-M2 transactivator and insulator-flanked reporter vectors. *Gene* **327** 61-73.
- Qu ZC, Thottassery JV, Van Ginkel S, Manuvakhova M, Westbrook L, Roland-Lazenby C, Hays S & Kern FG 2004b Homogeneity and long-term stability of tetracycline-regulated gene expression with low basal activity by using the rtTA2S-M2 transactivator and insulator-flanked reporter vectors. *Gene* **327** 61-73.
- Rahman MA, Hwang GL, Razak SA, Sohm F & Maclean N 2000 Copy number related transgene expression and mosaic somatic expression in hemizygous and homozygous transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Research* **9** 417-427.
- Rennel E & Gerwins P 2002 How to make tetracycline-regulated transgene expression go on and off. *Anal.Biochem.* **309** 79.
- Rizzuto G, Gorgoni B, Cappelletti M, Lazzaro D, Gloaguen I, Poli V, Sgura A, Cimini D, Ciliberto G, Cortese R, Fattori E & La Monica N 1999 Development of animal models for adeno-associated virus site-specific integration. *J.Virol.* **73** 2517-2526.
- Rose SD & MacDonald RJ 1997 Integration of tetracycline regulation into a cell-specific transcriptional enhancer. *J.Biol.Chem.* **272** 4735-4739.
- Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N & Schatz DG 1995 A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** 6522-6526.
- Stebbins MJ, Urlinger S, Byrne G, Bello B, Hillen W & Yin JC 2001 Tetracycline-inducible systems for *Drosophila*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** 10775-10780.
- Strathdee CA, McLeod MR & Hall JR 1999 Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* **229** 21-29.
- Theroux TL, Esbenshade TA, Peavy RD & Minneman KP 1996 Coupling efficiencies of human alpha 1-adrenergic receptor subtypes: titration of receptor density and responsiveness with inducible and repressible expression vectors. *Mol.Pharmacol.* **50** 1376-1387.
- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H & Hillen W 2000a Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** 7963-7968.
- Urlinger S, Helbl V, Guthmann J, Pook E, Grimm S & Hillen W 2000b The p65 domain from NF-kappaB is an efficient human activator in the tetracycline-regulatable gene expression system. *Gene* **247** 103-110.

Yin DX, Zhu L & Schimke RT 1996 Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal Biochem* **235** 195-201.

**2.3.- EVALUACIÓN DE DIFERENTES
VERSIONES DEL SISTEMA DE
REGULACIÓN POR TETRACICLINA PARA
EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE
GENES EXÓGENOS EN PECES**

2.3.1.- INTRODUCCIÓN

El número de genes aislados en peces ha aumentado mucho en los últimos años. Disponer de un sistema eficiente de control exógeno de la expresión génica es necesario tanto para realizar estudios básicos sobre la función de estos genes, como para desarrollar aplicaciones biotecnológicas. En peces, se han utilizado algunos sistemas homólogos para controlar la expresión de los genes exógenos, pero los resultados no han sido plenamente satisfactorios. Diferentes trabajos han descrito el uso del promotor de la metalotionina, clonado en varias especies de peces. Sin embargo, éste presenta problemas a causa de la naturaleza tóxica del inductor y el alto nivel basal de expresión que exhibe aún en ausencia del inductor (Chan & Devlin 1993). También se ha probado el uso del promotor de la proteína inducible por choque térmico, *hsp70*, para regular la expresión de genes exógenos en peces (Adam *et al.* 2000). En todos los casos se ha conseguido un buen nivel de inducción, pero ésta era sólo transitoria, y desaparecía una vez reparado el efecto del choque térmico que servía como inductor, no siendo conveniente mantener a los animales bajo una inducción permanente.

El sistema de regulación por tetraciclina desarrollado por Gossen y Bujard (Gossen & Bujard 1992) ha funcionado eficientemente en ratón (Furth *et al.* 1994; Kistner *et al.* 1996), en *Drosophila* (Stebbins *et al.* 2001) y en diferentes líneas celulares eucariotas (Howe *et al.* 1995; Izumi & Gilbert 1999; Strathdee *et al.* 1999; Gopalkrishnan *et al.* 1999). El sistema consiste en dos componentes; uno de ellos es una proteína de fusión (tTA) entre el represor de tetraciclina (TetR) de *Escherichia coli* y el dominio de activación transcripcional de la proteína VP16 del virus del herpes simple, lo que actúa como un transactivador fuerte. El segundo elemento del sistema es el promotor inducible, que controlará la expresión del gen de interés. Éste consiste en un promotor mínimo, precedido de varias copias del operador de la resistencia a tetraciclina de *E. coli* (*tetO*). En ausencia de tetraciclina el transactivador se une al operador y se inicia la transcripción. Sin embargo, en presencia de tetraciclina, el transactivador se une al antibiótico, lo que origina en él un cambio conformacional que

lo inhabilita para unirse al operador e iniciar la transcripción. A este sistema se le conoce como *tet-off*. Existe otra variante del sistema donde el transactivador (rtTA) es una proteína originada por mutagénesis al azar de tTA y es capaz de unirse a las secuencia del operador *tetO* solamente en presencia de tetraciclina (Gossen *et al.* 1995), por lo que se denomina *tet-on*. Este sistema es especialmente útil cuando la expresión del gen de interés sólo se requiere en periodos cortos de tiempo, pues así, se minimiza el uso de antibióticos. Debido a que TetR y *tetO* interactúan específicamente entre ellos, y a su origen procariota no existe interferencia de este sistema con los sistemas eucariotas. Esto evita muchos de los problemas que han invalidado otros sistemas de regulación de la expresión en organismos eucariotas. Además el inductor utilizado, tetraciclina, no presenta efectos adversos ya que dosis infraterapéuticas son suficientes para reprimir o activar el sistema. Los estudios realizados en peces sobre los efectos de la administración oral de tetraciclina, han revelado que ésta se distribuye de una manera eficiente entre los distintos tejidos del animal (Malvisi *et al.* 2003) y además no suprime la respuesta inmune (Tafalla *et al.* 2003). A pesar del enorme potencial del sistema de regulación por tetraciclina, su aplicación no siempre resulta eficiente. Así, aunque el sistema *tet-on* funciona bien en la mayoría de los estudios realizados en cultivos celulares y cultivos de tejidos, parece ser menos efectivo en animales transgénicos, donde su aplicación no está tan extendida como el sistema *tet-off* (Mansuy *et al.* 1998; Bieschke *et al.* 1998; Malleret *et al.* 2001).

En el subcapítulo anterior, se demostraba la eficiencia del sistema de regulación por tetraciclina en una línea celular de peces, EPC, y el mejor funcionamiento del sistema *tet-off*, con un promotor estable dirigiendo la expresión del transactivador, frente al uso del sistema *tet-on* o del sistema autorregulado. En este subcapítulo, se pretende evaluar la eficiencia de diferentes versiones del sistema de regulación por tetraciclina en peces mediante transferencia génica transitoria.

En el capítulo 1, se comentaban las diferentes aplicaciones que la técnica de la inyección intramuscular de DNA había tenido en mamíferos (Wolff *et al.* 1990; Acsadi *et al.* 1991; Raz *et al.* 1993; Raz *et al.* 1994). Los estudios en peces (Rahman & Maclean 1992; Kanellos *et al.* 1999; Verri *et al.* 2003; Romoren *et al.* 2004) han

demostrado que la técnica de inyección intramuscular de DNA es útil para inmunizar a los animales frente a ciertas enfermedades. Sin embargo, para que estas estrategias sean efectivas, se requiere un control estrecho sobre la expresión del gen introducido. Se ha descrito la utilización de vectores basados en adenovirus asociados conteniendo el sistema de regulación por tetraciclina (Bohl *et al.* 1998; Rendahl *et al.* 1998; Bohl & Heard 1998). A pesar del alto nivel de expresión y la estrecha regulación conseguida, el uso de virus no siempre es conveniente, por la dificultad de su manejo y por la desconfianza que provocan, en general. En mamíferos se ha ensayado el sistema de regulación por tetraciclina mediante inyección intramuscular o electroporación de sus componentes en músculo, y se ha comprobado su buen funcionamiento para regular exógenamente la expresión del gen introducido (Rizzuto *et al.* 1999; Perez *et al.* 2002; Wilson *et al.* 2005). Sin embargo, este tipo de trabajos no se han realizado todavía en peces.

Por todo esto, hemos considerado necesario evaluar el uso del sistema de regulación por tetraciclina para controlar la expresión de genes exógenos, introducidos mediante inyección intramuscular en peces. La especie escogida para este trabajo es la lubina (*Dicentrarchus labrax*). Este trabajo constituye el primer ensayo *in vivo* del sistema de regulación por tetraciclina en peces, y nos ha permitido predecir un correcto funcionamiento de este sistema cuando sea introducido de manera estable en peces transgénicos.

2.3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Plásmidos

pTet-On y **pTet-Off** (Clontech Labs, Palo Alto, CA) expresan respectivamente las proteínas híbridas rtTA y tTA de manera constitutiva, bajo el control del promotor y potenciador del virus citomegalovirus (CMV).

El plásmido **pTet-luc+**, que responde a la tetraciclina, está basado en el plásmido pBI-4 (Baron *et al.* 1995), que contiene un promotor bidireccional P_{bi-1} formado por 7

secuencias del operador *tetO* flanqueadas por dos promotores mínimos hCMV. Para su construcción, el gen de la luciferasa de luciérnaga (*luc+*) se insertó como un fragmento *PstI-NaeI* en los sitios *PstI* y *Sall* /Klenow de uno de los lados del promotor P_{bi-1} de pBI-4.

pTet-luc+-rtTA es un vector autorregulado, el transactivador rtTA y el gen de la luciferasa están corregulados por el promotor bidireccional sensible a tetraciclina P_{bi-1} (Baron *et al.* 1995). Para construirlo, *rtTA* se insertó como un fragmento *EcoRV-SpeI* en el plásmido Tet-luc+ digerido *PvuII-NheI* (ver 2.1) (Munoz *et al.* 2005).

pRL-CMV (PROMEGA, Madison, WI) es un plásmido que contiene el gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* bajo el control del promotor constitutivo CMV.

Inyección de DNA

Se usaron ejemplares jóvenes de lubina (*D. labrax*) con un peso comprendido entre 75 y 125 g para todos los experimentos. Los peces se mantuvieron en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (17-20°C). El DNA plasmídico se purificó utilizando una resina de intercambio iónico de Qiagen (Qiagen Inc. Chatsworth, Calif). El DNA se diluyó en tampón fosfato salino a la concentración requerida. Se añadió pintura acrílica para poder reconocer el sitio de inyección. 100 µl del DNA diluido se inyectaron en el músculo, en la parte rostro-ventral bajo la aleta dorsal. Los peces se anestesiaron por inmersión en 0.02% 2-fenoxietanol (Sigma), y se inyectaron usando una jeringa hipodérmica de insulina y una aguja de 26 ½ G. Los peces inyectados se alimentaron con pienso que contenía oxitetraciclina (60 g/kg de pienso) durante siete días antes de la inyección y tres días después de ella. Los peces no tratados se alimentaron con el pienso habitual durante toda la experiencia. Tres días después de la inyección los peces se sacrificaron y se extrajeron muestras del músculo. Para corregir la posible falta de homogeneidad del proceso de inyección, se introdujo el plásmido pRL-CMV en cada caso como referencia.

Ensayo de la luciferasa

Las muestras de músculo (100-300 mg) se homogenizaron en tres volúmenes de *Passive Lysis Buffer* (Promega). Posteriormente se centrifugaron durante 20 min a 15000 g. Se tomaron 20 µl de este lisado para medir la actividad luciferasa de luciérnaga y de *Renilla reniformis* con el kit *Dual Luciferase Assay* (Promega). La luz emitida se midió en un luminómetro (*Junior*, EG&G, Berthold) y se expresó como unidades relativas de luz (RLU). La actividad luciferasa relativa es el cociente entre la actividad luciferasa de luciérnaga y la actividad luciferasa de *Renilla reniformis*.

Análisis estadístico

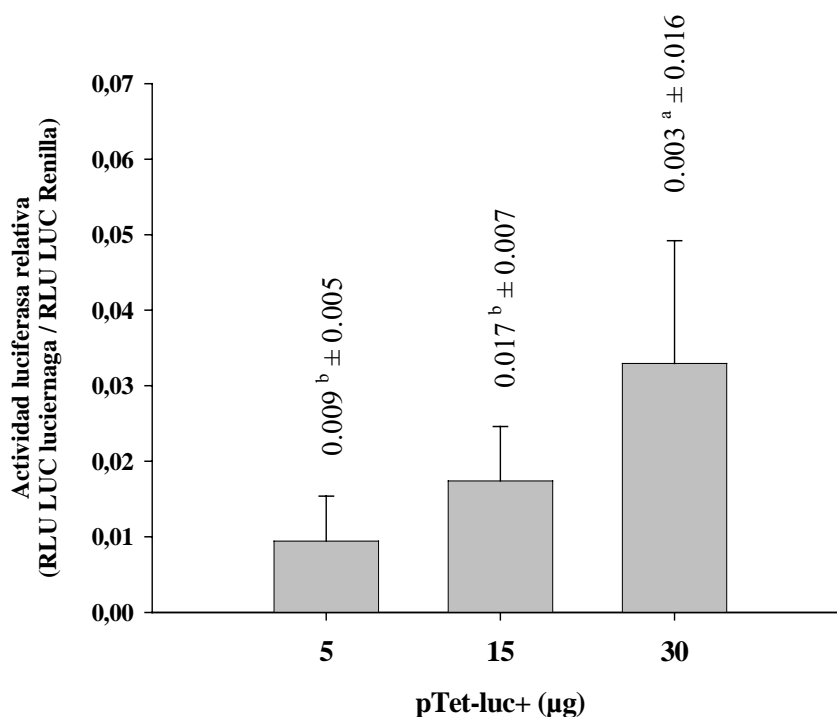
Los tratamientos estadísticos se llevaron a cabo con el programa SAS, Statistical Package, 1995. Sas Institute Inc. Cary, NC. USA. Para detectar diferencias significativas entre medias se utilizó un análisis de varianza de dos factores (Sokal & Rohlf 1981). La comparación de medias se realizó mediante el método secuencial de Student-Newman-Keuls (Snedekor & Cochran 1980).

2.3.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar el funcionamiento del sistema de regulación por tetraciclina en peces *in vivo*, se eligió la inyección de DNA en músculo como método de transferencia génica, y a la lubina como organismo diana. Las condiciones más óptimas para el uso de este método en lubina se han establecido previamente en nuestro laboratorio (ver 1.1).

Este trabajo es el primer estudio sobre la funcionalidad del sistema de regulación por tetraciclina en peces *in vivo*. Por esta razón, se han tenido que realizar ensayos preliminares para encontrar la mejor vía de administración del inductor tetraciclina. En ratones transgénicos conteniendo este sistema de regulación, el antibiótico se administra diluyéndolo en el agua de beber (Dhawan *et al.* 1995; Rizzuto *et al.* 1999). Así, en un primer ensayo disolvimos el antibiótico en el agua que contenía a los peces. A pesar de que se consiguió inducir la expresión génica (datos no

mostrados), esta alternativa resultaba contaminante y cara, por la gran cantidad de antibiótico que requería. La segunda vía probada fue la inyección intraperitoneal del antibiótico. Esta forma se rechazó porque causaba una mortalidad mayor entre los animales inyectados (datos no mostrados). Finalmente se eligió la inclusión de oxitetraciclina en el pienso de alimentación como forma de administración del inductor. Este método de administración resultó eficiente, además era menos contaminante y caro que su disolución en el agua; y metodológicamente, mucho más práctico que la inyección intraperitoneal. Posteriormente, se procedió a determinar qué dosis del plásmido sensible a tetraciclina y del plásmido que contiene el transactivador son las más adecuadas para su uso en peces. Para ello, se inyectaron, inicialmente, peces con diferentes cantidades del plásmido pTet-luc⁺ (5, 15, o 30 µg). Los resultados mostraron que 15 µg era la cantidad máxima de pTet-luc⁺, que se podía inyectar sin aumentar significativamente los niveles de expresión basal de luciferasa (fig 2.3.1); por lo tanto, se eligió esta dosis para los siguientes experimentos.



^{a,b} Las medias con una letra diferente son significativamente distintas

Fig 2.3.1.- Actividad luciferasa en peces inyectados con distintas dosis del plásmido pTet-luc+. La actividad luciferasa se calculó como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Cada barra representa la media de 5 muestras.

Para determinar la cantidad más óptima de transactivador tTA o rtTA, los peces se inyectaron con 15 µg de pTet-luc+ y diferentes dosis (0, 0.5, 3, 10, 20, 30 µg) de pTet-Off o pTet-On, respectivamente. En el caso de tTA (fig 2.3.2A), todas las dosis de transactivador utilizadas mostraron un incremento de la actividad luciferasa en condiciones de inducción. Desde una inducción de 40 veces obtenida con 0.5 µg de plásmido pTet-Off inyectado, hasta una inducción de 60 veces obtenida con 20 µg de plásmido conteniendo el transactivador. En todas las dosis, incluyendo la dosis óptima

de 20 μg , el nivel de expresión no inducida permanece bajo, en el mismo rango que aquellos peces a los que no se inyectó transactivador.

Cuando se utilizó el sistema rtTA (fig 2.3.2B), la dosis óptima de transactivador fue de 10 μg , ya que con esta cantidad de plásmido se consiguió el nivel mayor de inducción (10 veces) al añadir la oxitetraciclina, mientras el nivel de expresión en ausencia de antibiótico permanecía bajo, y similar al obtenido inyectando una cantidad menor de transactivador. Sin embargo, con dosis menores de transactivador (0.5 y 3 μg), apenas se consiguió inducción. Al usar dosis mayores de transactivador (20 μg y 30 μg) también se obtuvo una inducción significativa de la actividad luciferasa, no obstante, el nivel de expresión de la luciferasa en ausencia de antibiótico era demasiado elevado. Además los niveles absolutos de luciferasa en presencia de oxitetraciclina fueron menores a los obtenidos con 10 μg de transactivador.

El sistema *tet-on* mostró niveles absolutos de expresión inducida dos veces más bajos que el sistema *tet-off*. Así mismo, con el sistema *tet-on*, el nivel de expresión basal no inducida era más alto que el presentado por el sistema *tet-off*. Por todo ello, con el sistema *tet-off* se obtuvo una inducción máxima de 60 veces, mientras que con el sistema *tet-on* tan sólo fue de diez veces.

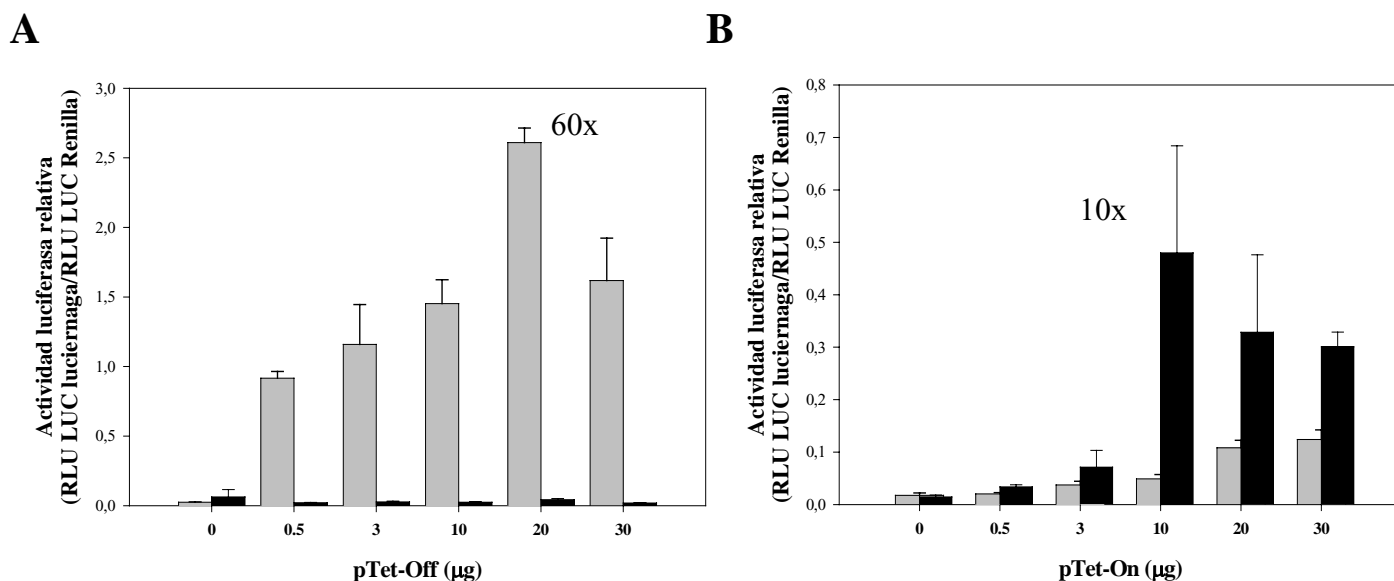


Fig 2.3.2.- (A) Actividad luciferasa en peces inyectados con 10 µg del plásmido pRL-CMV, 15 µg de pTet-luc+ y diferentes dosis de pTet-Off que contiene el transactivador rtTA (0, 0.5, 3, 10, 20, 30 µg). Cada barra representa la media de 5 muestras. El grado máximo de regulación (60 veces) se indica en la parte superior de la dosis correspondiente (20 µg) **(B)** Actividad luciferasa en peces inyectados con 10 µg del plásmido pRL-CMV, 15 µg de pTet-luc+ y diferentes dosis de pTet-On que contiene el transactivador rtTA (0, 0.5, 3, 10, 20, 30 µg). Cada barra representa la media de 10 muestras. El grado máximo de regulación (10 veces) se indica en la parte superior de la dosis correspondiente (10 µg). Las barras grises representan peces alimentados con el pienso habitual. Las barras negras representan peces alimentados con pienso conteniendo oxitetraciclina (60g/kg) La actividad luciferasa relativa se calculó como se indica en la sección de Material y Métodos.

Para mejorar la eficiencia del transactivador rtTA, se debe disminuir el nivel de expresión basal no inducida, y por tanto reducir la cantidad de transactivador. Para ello, se utilizó el plásmido autorregulado, pTet-luc+-rtTA. En este plásmido, los genes que codifican rtTA y luciferasa se encuentran bajo el control del promotor bidireccional que responde a tetraciclina P_{bi-1} . En ausencia del antibiótico ambos genes están silenciados. Cuando se añade tetraciclina, la cantidad de luciferasa y transactivador debe incrementarse. Las moléculas del transactivador resultantes de la expresión basal del promotor se unen a *tetO* y se inicia un bucle de retroalimentación positiva hasta el momento que se elimina la tetraciclina (Shockett *et al.* 1995; Strathdee *et al.* 1999). Este vector autorregulado pTet-luc+-rtTA ya se ha ensayado *in vitro*, en una línea celular de pez (ver 2.2). El nivel de inducción conseguido cuando se expresaba en

condiciones transitorias fue muy alto (más de 20 veces), comparado con los sistemas *tet-off* (12 veces) o el *tet-on* (6 veces) clásicos. Estos resultados apuntaban al uso de este plásmido autorregulado como una buena estrategia para modular la expresión de genes en músculo de pez. Se inyectaron peces con 25 µg del plásmido pTet-luc+-rtTA. A pesar de los buenos resultados obtenidos *in vitro*, la expresión de la luciferasa no aumentó en los peces alimentados con oxitetraciclina respecto a los peces inyectados pero no tratados (fig 2.3.3).

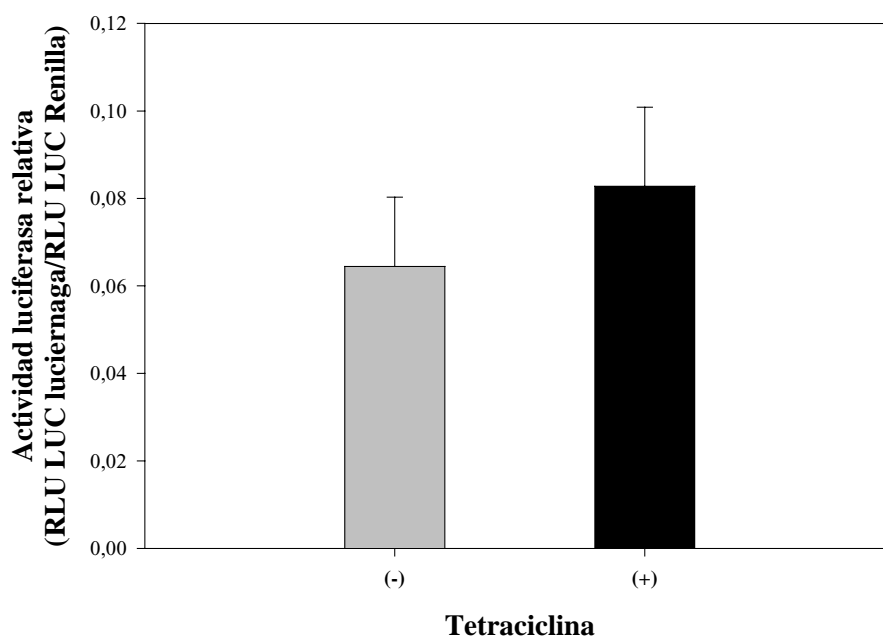


Fig 2.3.3.- Actividad luciferasa en peces inyectados con 25 µg del plásmido pTet-luc+-rtTA y 10 µg de pRL-CMV. La actividad luciferasa se calculó como se indica en la sección de Material y Métodos. Cada barra representa la media de 5 muestras. (-) animales alimentados con el pienso habitual. (+) animales alimentados con pienso conteniendo oxitetraciclina (60g/kg).

Al igual que lo descrito en mamíferos *in vivo*, nuestros resultados muestran que el sistema *tet-off* funciona más eficientemente que el sistema *tet-on* también en peces. Sin embargo, el hecho de que el nivel máximo de actividad luciferasa inducida

alcanzado con el sistema *tet-on* sea menor al alcanzado con *tet-off*, podría deberse a la naturaleza del inductor utilizado. Está descrito que el análogo más eficiente en la activación del transactivador rtTA es la doxiciclina (Baron *et al.* 1997), sin embargo, en este trabajo se ha utilizado oxitetraciclina. Por lo tanto, el uso de pienso con doxiciclina podría mejorar la activación del sistema *tet-on*. Además, se ha demostrado que el transactivador rtTA presenta cierta afinidad por unirse a *tetO*, aún en ausencia del inductor, y es menos estable que el transactivador tTA (Urlinger *et al.* 2000). Estas pueden ser algunas de las causas que han impedido establecer el sistema *tet-on* en distintos animales transgénicos. Para superar estas limitaciones del sistema, se ha construido un nuevo transactivador rtTA, rtTA2^s-M2, que es más sensible a la doxiciclina, más estable, y que no presenta unión al operador en condiciones de no inducción (Urlinger *et al.* 2000). El uso de este nuevo transactivador, podría contribuir a disminuir los altos niveles basales obtenidos con el sistema *tet-on* también en peces, y conseguir así una inducción mayor.

En cualquier caso, hemos demostrado que el sistema *tet-on*, también permite la inducción de genes exógenos en peces, aunque la cantidad de transactivador necesaria para conseguir una regulación eficiente es mayor en lubina que en ratón (Rizzuto *et al.* 1999). Este hecho, junto con los problemas asociados a rtTA comentados anteriormente, explicarían en parte el funcionamiento negativo del plásmido autorregulado, pTet-luc⁺-rtTA. Es posible que la cantidad inicial de transactivador, resultante del escape del promotor, sea demasiado baja, y no resulte suficiente para iniciar el bucle retroalimentativo. De hecho, la actividad luciferasa obtenida con la inyección de 25 µg del plásmido autorregulado y posterior inducción es muy poca, del mismo orden que la obtenida al inyectar las cantidades más bajas del transactivador rtTA junto a pTet-luc⁺.

2.3.4.- CONCLUSIONES

El ensayo, por primera vez en peces, del sistema de regulación por tetraciclina nos ha permitido determinar las condiciones de uso, la versión del sistema y la proporción de plásmidos más apropiada para un funcionamiento eficiente. El sistema *tet-off* fue el más eficiente para inducir la expresión génica, al igual que se observó *in vitro* utilizando una línea celular de pez. Con el sistema *tet-on* también se pudo modular la expresión de genes exógenos introducidos en músculo de lubina, aunque con una eficiencia menor.

Con la versión autorregulada del sistema no se consiguió inducción de la expresión, con lo que su uso quizás no sea aconsejable en experimentos *in vivo* en peces. Sin embargo, estos resultados podrían mejorar si se usa el antibiótico más adecuado para activar el sistema, o el transactivador rtTA2^s-M2 (Urlinger *et al.* 2000).

Basándonos en los resultados del presente trabajo, podemos concluir que el sistema de regulación por tetraciclina es útil para el control exógeno de la expresión génica en peces, siendo la versión *tet-off* del sistema la más eficiente.

Bibliografía

- Acsadi G, Dickson G, Love DR, Jani A, Walsh FS, Gurusinghe A, Wolff JA & Davies KE 1991 Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* **352** 815-818.
- Adam A, Bartfai R, Lele Z, Krone PH & Orban L 2000 Heat-inducible expression of a reporter gene detected by transient assay in zebrafish. *Exp. Cell Res.* **256** 282-290.
- Baron U, Freundlieb S, Gossen M & Bujard H 1995 Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* **23** 3605-3606.
- Baron U, Gossen M & Bujard H 1997 Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: Novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Research* **25** 2723-2729.
- Bieschke ET, Wheeler JC & Tower J 1998 Doxycycline-induced transgene expression during *Drosophila* development and aging. *Mol. Gen. Genet.* **258** 571-579.
- Bohl D & Heard JM 1998 Transcriptional modulation of foreign gene expression in engineered somatic tissues. *Cell Biology and Toxicology* **14** 83-94.

- Bohl D, Salvetti A, Moullier P & Heard JM 1998 Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood* **92** 1512-1517.
- Chan WK & Devlin RH 1993 Polymerase chain reaction amplification and functional characterization of sockeye salmon histone H3, metallothionein-B, and protamine promoters. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **2** 308-318.
- Dhawan J, Rando TA, Elson SL, Bujard H & Blau HM 1995 Tetracycline-regulated gene expression following direct gene transfer into mouse skeletal muscle. *Somat.Cell Mol.Genet.* **21** 233-240.
- Furth PA, St Onge L, Boger H, Gruss P, Gossen M, Kistner A, Bujard H & Hennighausen L 1994 Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **91** 9302-9306.
- Gopalkrishnan RV, Christiansen KA, Goldstein NI, DePinho RA & Fisher PB 1999 Use of the human EF-1alpha promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **27** 4775-4782.
- Gossen M & Bujard H 1992 Tight Control of Gene-Expression in Mammalian-Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** 5547-5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W & Bujard H 1995 Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268** 1766-1769.
- Howe JR, Skryabin BV, Belcher SM, Zerillo CA & Schmauss C 1995 The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J.Biol.Chem.* **270** 14168-14174.
- Izumi M & Gilbert DM 1999 Homogeneous tetracycline-regulatable gene expression in mammalian fibroblasts. *J Cell Biochem* **76** 280-289.
- Kanellos T, Sylvester ID, Howard CR & Russell PH 1999 DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish. *Vaccine* **17** 965-972.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lubbert H & Bujard H 1996 Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** 10933-10938.
- Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG & Mansuy IM 2001 Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* **104** 675-686.
- Malvisi J, della Roca G, Anfssi P, Zaguini A, Tomasi L, Magni A, Zanchetta A, Sello M & Giorgetti G 2003 Tissue disposition and residue kinetics of oxytetracycline, flumequine, amoxicillin and thiamphenicol in sea bream (*Sparus aurata*) after oral administration. In *In: Proceedings of the International Symposium of Progress and Prospect of Marine Biotechnology.(ISPPMB '98)Qingdao, China. pp 139-146.*
- Mansuy IM, Winder DG, Moallem TM, Osman M, Mayford M, Hawkins RD & Kandel ER 1998 Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron* **21** 257-265.

- Munoz I, Carrillo M, Zanuy S & Gómez A 2005 Regulation of exogenous gene in fish cells: an evaluation of several tetracycline regulated systems under the control of different promoters. *Gene*.
- Perez N, Plence P, Millet V, Greuet D, Minot C, Noel D, Danos O, Jorgensen C & Apparailly F 2002 Tetracycline transcriptional silencer tightly controls transgene expression after in vivo intramuscular electrotransfer: application to interleukin 10 therapy in experimental arthritis. *Hum.Gene Ther.* **13** 2161-2172.
- Rahman A & Maclean N 1992 Fish transgene expression by direct injection into fish muscle. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 286-289.
- Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D, Yankauckas MA & . 1994 Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **91** 9519-9523.
- Raz E, Watanabe A, Baird SM, Eisenberg RA, Parr TB, Lotz M, Kipps TJ & Carson DA 1993 Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **90** 4523-4527.
- Rendahl KG, Leff SE, Otten GR, Spratt SK, Bohl D, Van Roey M, Donahue BA, Cohen LK, Mandel RJ, Danos O & Snyder RO 1998 Regulation of gene expression in vivo following transduction by two separate rAAV vectors. *Nature Biotechnology* **16** 757-761.
- Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D, Savino R, Lazzaro D, Costa P, Mathiesen I, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R, La Monica N & Fattori E 1999 Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **96** 6417-6422.
- Romoren K, Thu BJ & Evensen O 2004 Expression of luciferase in selected organs following delivery of naked and formulated DNA to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by different routes of administration. *Fish Shellfish Immunol.* **16** 251-264.
- Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N & Schatz DG 1995 A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** 6522-6526.
- Snedekor GW & Cochran WG 1980 *Statistical Methods*. Thr Iowa State University Press, Ames, IA.
- Sokal RR & Rohlf FJ 1981 *Biometry*. Freeman and Company, London.
- Stebbins MJ, Urlinger S, Byrne G, Bello B, Hillen W & Yin JC 2001 Tetracycline-inducible systems for *Drosophila*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** 10775-10780.
- Strathdee CA, McLeod MR & Hall JR 1999 Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* **229** 21-29.
- Tafalla C, Novoa B, Alvarez JM & Figueras A 2003 *In vivo* and *in vitro* effect of oxytetracycline treatment on the immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of fish diseases* **22** 271-276.
- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H & Hillen W 2000 Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** 7963-7968.

- Verri T, Ingrosso L, Chiloiro R, Danieli A, Zonno V, Alifano P, Romano N, Scapigliati G, Vilella S & Storelli C 2003 Assessment of DNA vaccine potential for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by intramuscular injection of a reporter gene. *Fish Shellfish.Immunol.* **15** 283-295.
- Wilson MO, Scougall KT, Ratanamart J, McIntyre EA & Shaw JAM 2005 Tetracycline-regulated secretion of human (pro)insulin following plasmid-mediated transfection of human muscle. *Journal of Molecular Endocrinology* **34** 391-403.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A & Felgner PL 1990 Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247** 1465-1468.

CAPÍTULO 3

MODELOS *INVITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA LUBINA

3.- EVALUACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE LUBINA PARA SU USO EN APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

3.1.- INTRODUCCIÓN

Las líneas celulares establecidas son una herramienta importante para realizar estudios básicos sobre función génica, y para trabajos biotecnológicos. En mamíferos, existe una gran variedad de líneas celulares bien caracterizadas que permiten abordar estudios de diversa índole. Sin embargo, el número de líneas celulares procedentes de organismos marinos es pequeño, y su aplicabilidad en estudios biotecnológicos no ha sido en muchos casos evaluada. La identificación de genes nuevos de peces ha aumentado mucho en los últimos años. Debido a la falta de líneas celulares conespecíficas adecuadas se utilizan generalmente sistemas heterólogos, mayormente de mamíferos, para el estudio de la función génica. Estos sistemas pueden ser inadecuados en algunos casos, como aquellos en los que se estudian rutas intracelulares, pues se necesita la interacción del producto génico con ciertas secuencias de DNA u otras proteínas, y éstas sólo pueden asegurarse en un sistema de la misma especie o de una lo más relacionada posible. La necesidad de crear y estudiar nuevas líneas celulares marinas queda ratificada por las conclusiones a las que se llegó en la conferencia celebrada en el laboratorio biológico “Mount Desert Island” en Salisbury Cove, Maine, US, (Wise *et al.* 2002).

La lubina (*Dicentrarchus labrax*) es una especie marina de gran importancia económica y comercial en los países mediterráneos. Los estudios sobre fisiología y genética en lubina han dado lugar en los últimos años, al aislamiento e identificación de un número creciente de genes. Además iniciativas como el proyecto BassMap (www.bassmap.org) incrementarán en los próximos años el número de secuencias codificantes conocidas en lubina. A pesar de este aumento en el número de genes aislados, no se ha realizado el mismo esfuerzo en la generación de otro tipo de herramientas que puedan servir para conocer mejor la función estos genes y su implicación fisiológica, como base de una mejora en la producción de la lubina. En ésta, como en la mayoría de especies de peces marinos, el estudio de la función génica se realiza utilizando sistemas heterólogos, fundamentalmente líneas celulares de mamíferos, debido a la falta de líneas de lubina que permitan la expresión y estudio de

genes exógenos. Estas líneas también son esenciales, como modelos *in vitro*, para evaluar el comportamiento de ciertas construcciones conteniendo transgenes, con vistas a experimentos de manipulación génica *in vivo*.

Existe una línea celular establecida a partir de larvas de lubina (J. Castric, no publicado) y denominada SBL (*Sea Bass Larvae*). Esta línea se ha utilizado fundamentalmente como recipiente para la propagación de virus (Delsert *et al.* 1997), pero no se han evaluado sus características como sistema para estudios de transferencia génica. El uso de esta línea celular como modelo para la expresión de genes exógenos de lubina, abriría nuevas posibilidades tanto en estudios de la función génica como en el proceso de generación de ejemplares transgénicos de lubina.

Con el presente estudio se ha pretendido evaluar el uso de la línea celular SBL para estudios de función génica. Para ello, se han alcanzado los siguientes objetivos, (i) demostrar la capacidad de estas células para incorporar DNA exógeno, (ii) determinar el método y las condiciones más óptimas para su transfección con DNA plasmídico, (iii) comparar la funcionalidad de promotores de origen distinto (iv) comprobar la utilidad del sistema de regulación por tetraciclina en esta línea celular (v) evaluar la capacidad de secreción de las proteínas codificadas por los genes introducidos en células SBL.

3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Plásmidos de expresión

El plásmido **pCMVtk-luc+**, contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor constitutivo CMVtk. Este promotor contiene la secuencia potenciadora del promotor del citomegalovirus (CMV) unida al promotor de la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simple.

El plásmido **p β -actin-luc+**, se construyó insertando un fragmento *SpeI-NcoI* de 4.6 kb del plásmido pP3PalacZ-carp β A (Alam *et al.* 1996) que contiene secuencias reguladoras (promotor, primer exón no traducido y primer intrón) del gen de la actina β

de carpa, en el plásmido pLUC⁺ (Altschmied & Duschl 1997), para dirigir la expresión del gen de la luciferasa.

El plásmido **pCMVtk-GFP**, se construyó sobre la base del plásmido pBI4-GFP (Baron *et al.* 1995) que contiene el gen de la GFP bajo el control del promotor sensible a tetraciclina P_{bi-1}. El plásmido pBI4-GFP se digirió con *PvuII* y *SalI* para extraer el promotor mencionado. En su lugar se insertó el promotor constitutivo CMVtk como un fragmento *SalI-XhoI*/Klenow.

Para evaluar el sistema de regulación por tetraciclina se utilizaron los plásmidos: (i) **pTet-On** (Clontech Labs, Palo Alto, CA) que contiene el transactivador híbrido rtTA bajo el control del promotor y potenciador CMV (ii) **pTet-luc⁺**, que está basado en el plásmido pBI-4 (Baron *et al.* 1995), y contiene un promotor bidireccional que responde a tetraciclina (P_{bi-1}) formado por 7 secuencias del operador *tetO* flanqueadas por dos promotores mínimos hCMV. Para construir pTet-luc⁺, el gen de la luciferasa de luciérnaga se insertó como un fragmento *PstI-NaeI* en los sitios *PstI* y *SalI* /Klenow de uno de los lados del promotor P_{bi-1} del plásmido pBI-4.

El plásmido **pssNPY-Luc** contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga precedido en fase por la secuencia señal del neuropeptido Y de lubina (NPY). Para su construcción se amplificó, por una parte un fragmento que contenía el extremo 5' no traducido, el ATG de inicio y la secuencia codificante del péptido señal del neuropeptido Y de lubina (Cerdeira-Reverter *et al.* 2000). En los extremos de este fragmento se introdujeron sitios *XhoI* y *NcoI*. Por otra parte se modificó el ATG de inicio del gen de la luciferasa para convertirlo en un sitio de restricción *NcoI*, que permitiera su unión en fase con el péptido señal del NPY. Finalmente sobre la base del plásmido pCMVtk-luc, se sustituyó el gen de la luciferasa por este otro gen de luciferasa conteniendo una secuencia señal.

Obtención del DNA plasmídico

Para la propagación de los diferentes plásmidos se transformó *Escherichia coli* DH5 α según el método de Hanahan (Hanahan 1983). El DNA plasmídico se purificó

utilizando una resina de intercambio aniónico de Qiagen (Qiagen Inc. Chatsworth, Calif).

Cultivo celular y transfecciones

Las células SBL se crecieron en la mezcla de nutrientes MEM (*Minimum Essential Medium*) con sales de Hanks (Gibco-BRL), complementada con un 10% de suero bovino fetal, 100 unidades/ml de penicilina, 100 unidades/ml de estreptomycin y 0.25 µg/ml de anfotericina B. Se incubaron entre 25 y 30°C sin CO₂. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y tras 16-18 horas se transfectaron usando FuGENE (Roche) o Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En los experimentos con el sistema de regulación por tetraciclina, se usó doxiciclina (2 µg/ml, Sigma) para inducir el sistema.

Ensayo de la actividad luciferasa y la proteína verde fluorescente

Para medir la actividad luciferasa las células se lavaron con PBS, se lisaron con *Passive Lysis Buffer* (Promega) y se recogieron de las placas. Posteriormente se eliminó el material insoluble por centrifugación (15000 g durante 20 min). Se mezclaron 20 µl del lisado con 200 µl del reactivo luciferina (20 mM TricinaKOH, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 8 mM MgCl₂, 33.3 mM DTT, 270 µM CoA, 530 µM ATP, 400 µM luciferina). La luz emitida se midió en un luminómetro (*Junior* EG&G, Berthold) y se expresó como unidades relativas de luz (RLU).

La expresión de GFP se monitorizó en las células mediante un microscopio de fluorescencia (Olympus IX71).

Análisis estadísticos

Todos los tratamientos estadísticos se realizaron mediante el procedimiento ANOVA del paquete informático SAS, Statistical Package, 1995. Sas Institute Inc. Cary, NC. USA. En los experimentos con FuGENE, para analizar el efecto de las distintas condiciones de la transfección o la concentración celular sobre la actividad luciferasa, se realizó un análisis de varianza de una vía. En los experimentos con Lipofectamine

2000, los datos se analizaron por un análisis de varianza de dos factores (condición de la transfección y concentración celular) con interacción entre ellos (Sokal & Rohlf 1981). La comparación de medias se realizó mediante el método secuencial de Student-Newman-Keuls (Snedekor & Cochran 1980).

3.3.- RESULTADOS

Transfección de la línea celular SBL. Comparación de los reactivos Lipofectamina y FuGENE

La primera evidencia de que la línea celular SBL se podía transfectar, se obtuvo tras introducir un plásmido de expresión conteniendo el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* mediante el método de precipitación con fosfato cálcico (Chen & Okayama 1987; Chen & Okayama 1988). Tras la incubación de las células transfectadas con el sustrato X-gal, y posterior revelado, se pudo detectar actividad β -galactosidasa en células SBL. Sin embargo, en términos de eficiencia, el número de células transfectadas fue muy bajo (datos no mostrados).

Para poder obtener un mayor porcentaje de células transfectadas se decidió ensayar dos reactivos comerciales de base lipídica, Lipofectamine 2000 y FuGENE. Para determinar las condiciones más óptimas de transfección, se ensayaron distintas condiciones mediante la combinación de diferentes cantidades de reactivo y DNA, y también distintas concentraciones de células.

En los experimentos con Lipofectamine 2000 se ensayaron seis condiciones distintas combinando, dos cantidades de DNA (0.55 o 0.8 μ g) y tres de reactivo (1, 2 o 3 μ l). Con éstas condiciones se transfectaron células SBL sembradas a dos densidades celulares distintas (2.5×10^5 o 3×10^5 células/pocillo). Los plásmidos utilizados para las transfecciones fueron pCMVtk-luc+ o pCMVtk-GFP. El experimento se repitió dos veces.

Los resultados del análisis estadístico ANOVA indican que la actividad luciferasa obtenida depende de la condición en la que se realiza la transfección

($F=51.62$, $p<.01$) y en la concentración celular ($F=76.57$, $p<.01$), no siendo significativo el efecto de la interacción entre la condición y la densidad celular ($F=1.44$, $p >.01$).

No se observaron diferencias entre las dos cantidades de DNA utilizadas cuando la cantidad de reactivo era la misma. Sin embargo, se observó que las condiciones en las que se utilizaba una mayor cantidad de reactivo eran las más eficientes, independientemente de la cantidad de DNA utilizada (fig 3.1A)

Según las indicaciones del fabricante de Lipofectamine 2000, la densidad celular en la placa debe ser alta para obtener una transfección eficiente y niveles altos de expresión. Se recomienda una confluencia en torno al 90-95% en el momento de la transfección, para minimizar posibles efectos de disminución del crecimiento celular asociado con la transfección. Por este motivo, se ensayaron sólo dos cantidades de células en placas de 24 pocillos, 2.5×10^5 células/pocillo y 3×10^5 células/pocillo, lo que equivalía a células confluentes a un 85-90% y 90-95%, respectivamente. Los resultados muestran que la actividad luciferasa fue significativamente mayor al transfectar células a una concentración 2.5×10^5 , siendo preferible el uso de densidades con el 85% de células confluentes a otras mayores (fig 3.1B)

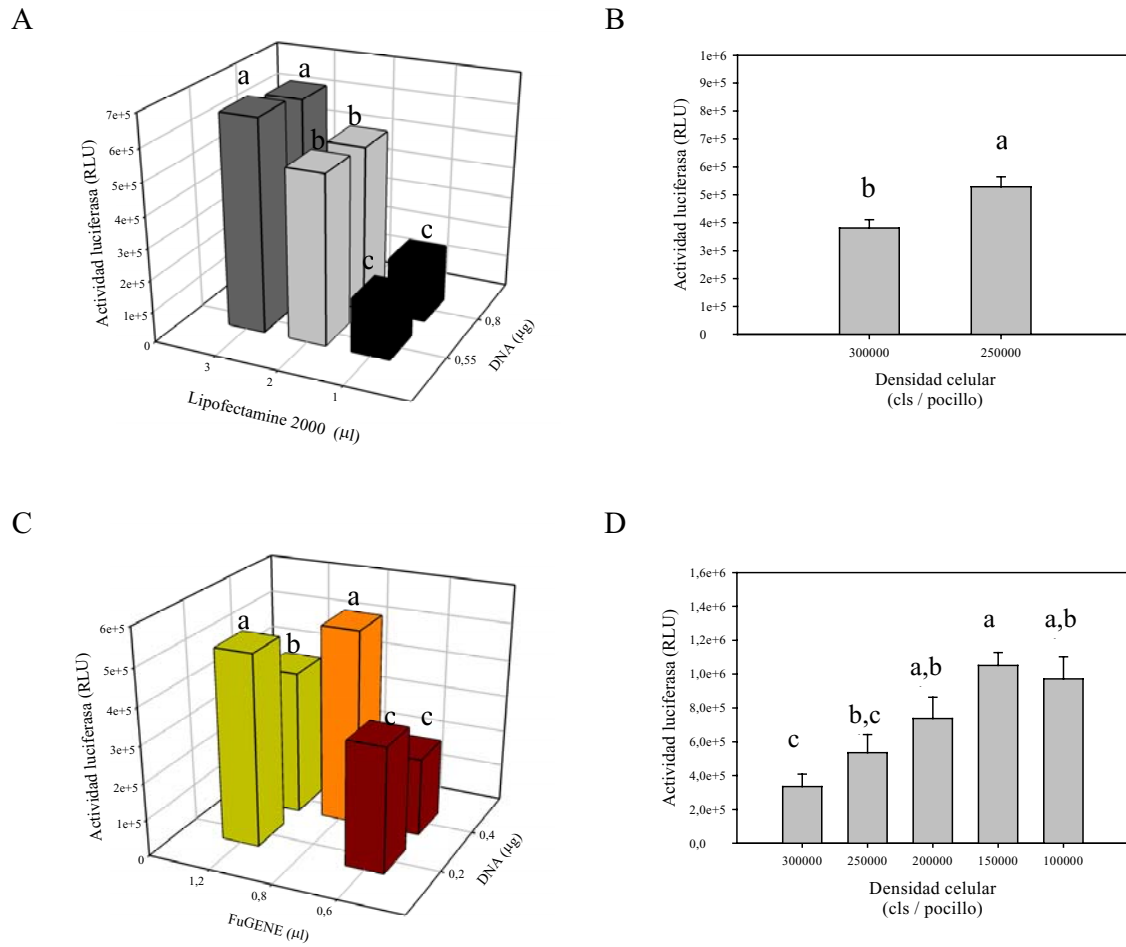


Fig 3.1.- Eficiencia de la transfección en células SBL bajo distintas condiciones. Las barras representan la media de las unidades relativas de luz (RLU) obtenidas en células tranfectadas con: **(A)** el reactivo Lipofectamine 2000 en seis condiciones diferentes **(B)** el reactivo Lipofectamine 2000 en dos densidades celulares diferentes **(C)** el reactivo FuGENE en cinco condiciones diferentes **(D)** el reactivo FuGENE en cinco densidades celulares diferentes. Las medias que difieren estadísticamente ($P < 0.05$) se indican mediante letras diferentes en la parte superior de las barras.

La observación directa de la fluorescencia debida a la GFP en células transfectadas con el plásmido pCMVtk-GFP, confirmó los resultados y conclusiones de los experimentos realizados con pCMVtk-luc+. Se observó que al utilizar la dosis más alta de lipofectamina (3 μ l), muchas de las células que expresaban GFP morían, posiblemente por un efecto tóxico del reactivo (fig 3.2).

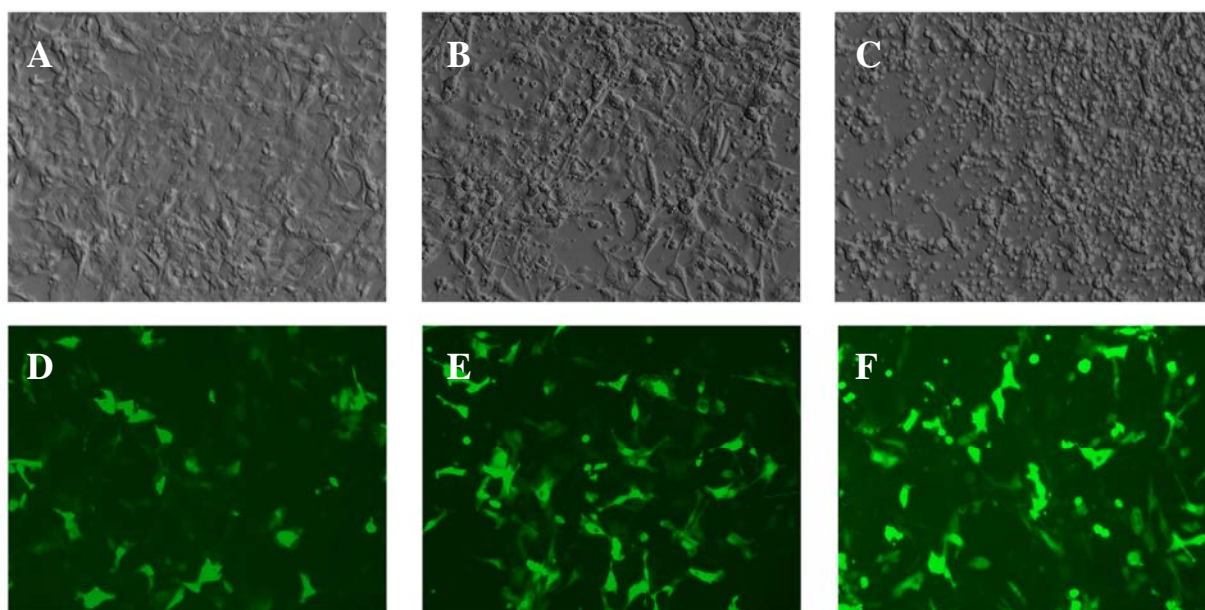


Fig 3.2.- Células SBL transfectadas con diferentes cantidades del reactivo Lipofectamine 2000: 1 μ l (A y D), 2 μ l (B y E), 3 μ l (C y F). (A, B, C) Observación microscópica con luz blanca. (D, E, F) Microscopia de fluorescencia para observar la presencia de GFP.

En los experimentos con FuGENE, se determinó inicialmente la cantidad y relación FUGENE (μ l) : DNA (μ g) más óptima para la transfección. Para ello, se transfectaron células SBL con los plásmidos pCMVtk-luc+ o pCMVtk-GFP, en cinco condiciones distintas:

1	2	3	4	5
1.2 μ l reactivo	0.8 μ l reactivo	1.2 μ l reactivo	0.6 μ l reactivo	0.6 μ l reactivo
0.2 μ g DNA	0.4 μ g DNA	0.4 μ g DNA	0.2 μ g DNA	0.4 μ g DNA

El experimento se repitió dos veces. Los resultados de la prueba estadística ANOVA indicaron que la condición en la que se realizaba la transfección influía sobre la actividad luciferasa de las células transfectadas ($F=11.24$, $p<.01$). Se observó que utilizando cantidades bajas del reactivo FuGENE (0.6 μ l), se obtenía una menor actividad luciferasa, independientemente de la cantidad de DNA utilizada. El uso de cantidades superiores de FuGENE (0.8 y 1.2 μ l) fue igual de eficiente, si bien cuando se usaron las mayores concentraciones de FuGENE y DNA (1.2 μ l : 0.4 μ g) esta eficiencia disminuyó (fig 3.1C).

Según las indicaciones del fabricante de FuGENE, las células deben tener entre un 50-80% de confluencia para asegurar una buena transfección. Para determinar la concentración óptima de células SBL para una transfección eficiente con FuGENE, se ensayaron distintas densidades celulares en placa de 24 pocillos correspondientes a un rango entre el 40 y 95% de confluencia al día siguiente de ser sembradas (3×10^5 , $2,5 \times 10^5$, 2×10^5 , $1,5 \times 10^5$, 1×10^5 células/pocillo, fig. 3.3). El experimento se repitió dos veces.

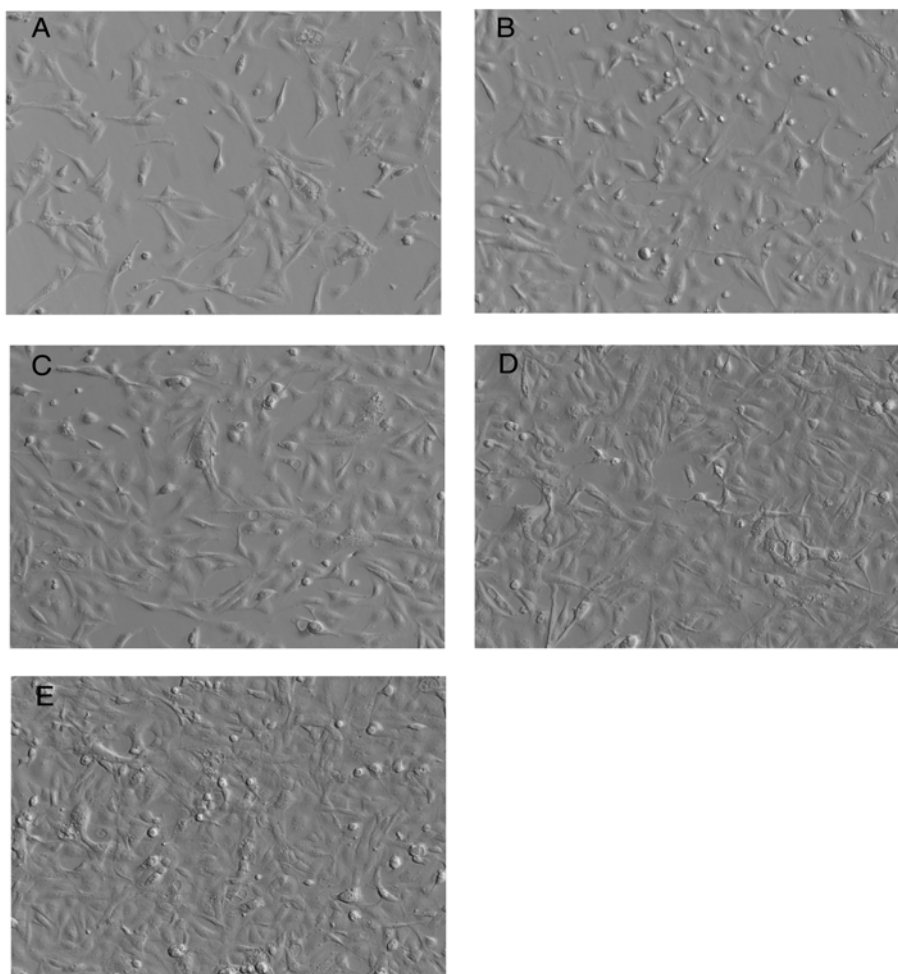


Fig 3.3.- Distintas densidades de células SBL al día siguiente de haber sido sembradas en placa de 24 pocillos: (A) 1×10^5 células/pocillo (B) $1,5 \times 10^5$ células/pocillo (C) 2×10^5 células/pocillo (D) $2,5 \times 10^5$ células/pocillo (E) 3×10^5 células/pocillo.

Los resultados de la prueba estadística ANOVA indicaron que la actividad luciferasa obtenida en las células transfectadas dependía de la densidad celular ($F=5.85$, $p<.01$). Por tanto, la eficiencia de la transfección de células SBL con el reactivo FuGENE depende de la densidad celular. La actividad luciferasa aumentaba con el uso de densidades celulares menores hasta llegar a una concentración óptima de 1.5×10^5 células en un pocillo de placa de 24. Con concentraciones celulares más bajas no se obtenía un mejor rendimiento de la transfección (fig 3.1D).

La observación directa de la fluorescencia de las células transfectadas con el plásmido pCMVtk-GFP, confirmó los resultados y conclusiones de los experimentos realizados con pCMVtk-luc+. Al comparar el reactivo Lipofectamine 2000 con el reactivo FuGENE, se observó que el número de células muertas tras la transfección era menor con este último, aún usando las mayores cantidades de FuGENE.

Comparación de los promotores CMVtk y actina β de carpa para dirigir la expresión de genes exógenos en células SBL

Para evaluar el comportamiento de las células SBL en cuanto a niveles de expresión génica se ensayaron dos promotores. El promotor híbrido de origen viral CMVtk, que contiene la secuencia potenciadora del promotor del citomegalovirus (CMV) unido al promotor de la timidina quinasa del virus herpes simple (tk), y un promotor de origen piscícola, el de la actina β de carpa. Se transfectaron células SBL con dos construcciones, que contienen el gen de la luciferasa precedido en cada caso por uno de los promotores mencionados.

Ambos promotores fueron funcionales en células SBL. Sin embargo, cuando la expresión del gen de la luciferasa se encuentra bajo el control del promotor CMVtk, se consigue un nivel de expresión diez veces mayor que cuando se utiliza el promotor de la actina β de carpa (fig 3.4).

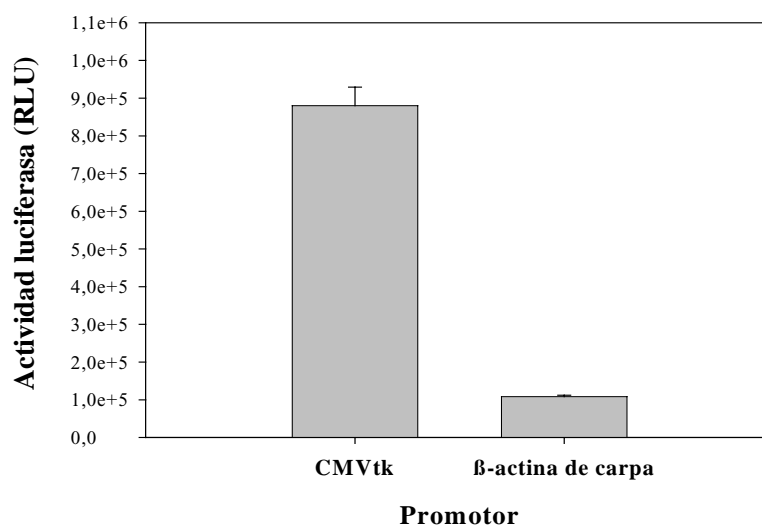


Fig 3.4.- Actividad luciferasa (RLU) de las células SBL transfectadas con el gen de la luciferasa dirigido por dos promotores, CMVtk o el promotor de la actina β de carpa. Cada columna representa la media de diez transfecciones independientes.

Control de la expresión de genes exógenos por el sistema de regulación por tetraciclina

Se realizaron transfecciones transitorias en células SBL con el plásmido pTet-luc+ que responde a tetraciclina, o bien de éste cotransfectado con el plásmido pTet-On, que contiene el transactivador de este sistema de regulación. En aquellas células transfectadas sólo con el plásmido pTet-luc+, se comprobó que la actividad luciferasa producida apenas doblaba el ruido de fondo obtenido en células sin transfectar, indicando que este promotor era capaz de mantener silenciada la expresión génica en ausencia de transactivador e inductor. Por otra parte, en las células cotransfectadas con los dos plásmidos del sistema, se producía un incremento de la actividad luciferasa de tres veces cuando se inducían con doxiciclina, comparando con células no inducidas. Este incremento resulta mayor si lo comparamos con la actividad luciferasa que muestran las células que contienen sólo pTet-luc+, pues la presencia del transactivador, sin el inductor, provoca un aumento de la actividad basal de aproximadamente 6 veces (fig 3.5).

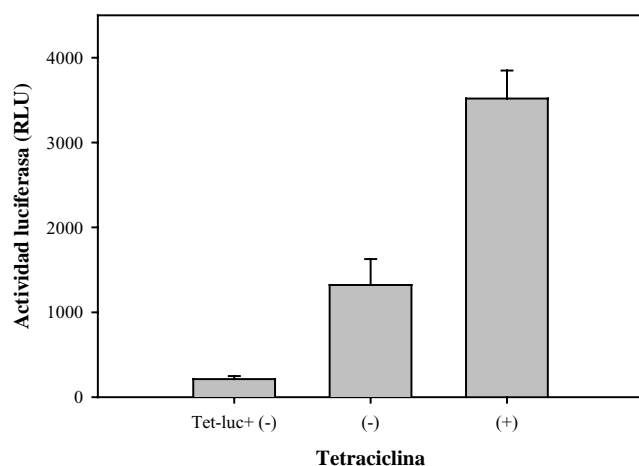


Fig 3.5.- Actividad luciferasa en células SBL transfectadas sólo con pTet-luc+ y cultivadas sin doxyciclina (columna izquierda) o con pTet-luc+ y pTet-On en ausencia (columna central) o presencia (columna derecha) de doxyciclina. Cada columna representa la media de dos a seis transfecciones independientes.

Evaluación de la capacidad de secreción de proteínas exógenas: transfección con genes que codifican proteínas secretables

Una de las características deseables, en las líneas celulares que se utilizan en aplicaciones biotecnológicas, es la capacidad de secretar al medio los productos de los genes introducidos. Para evaluar la capacidad de secreción de la línea celular SBL, se realizaron transfecciones transitorias con dos plásmidos distintos. Uno de ellos es el plásmido pCMVtk-luc+ que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga modificado. Este producto génico una vez sintetizado permanece en el citoplasma celular (Sherf & Wood 1994), en lugar de dirigirse a los perixosomas y glioxisomas como ocurre con la luciferasa nativa (Keller *et al.* 1987). El otro plásmido utilizado, pssNPY-luc+, posee el mismo gen y promotor, pero en este caso al gen de la luciferasa se le añadió en su extremo 5' una secuencia que codifica el péptido señal del gen del neuropeptido Y de lubina, y que permite que las células del cerebro que lo producen lo secreten (Cerdá-Reverter *et al.* 2000). Por lo tanto, la expresión de este plásmido debe producir una luciferasa modificada con las secuencias apropiadas para ser secretada. Tres días después de la transfección con cada uno de estos plásmidos, se recogieron tanto el medio condicionado como las células transfectadas para medir la actividad luciferasa.

Se observó que, la luciferasa secretada al medio en las células transfectadas con pssNPY-luc+ representa casi un 70% de la luciferasa total que estas células producen; mientras que la luciferasa secretada al medio por las células transfectadas con

pCMVtk-luc+, apenas representa un 8% de la luciferasa total producida. Es probable que, esta pequeña proporción de luciferasa en el medio sea un producto de lisis de las células muertas, y no se deba realmente a un proceso de secreción. Estos resultados demuestran que la línea celular SBL es capaz de secretar de manera eficiente productos sintetizados a partir de genes exógenos.

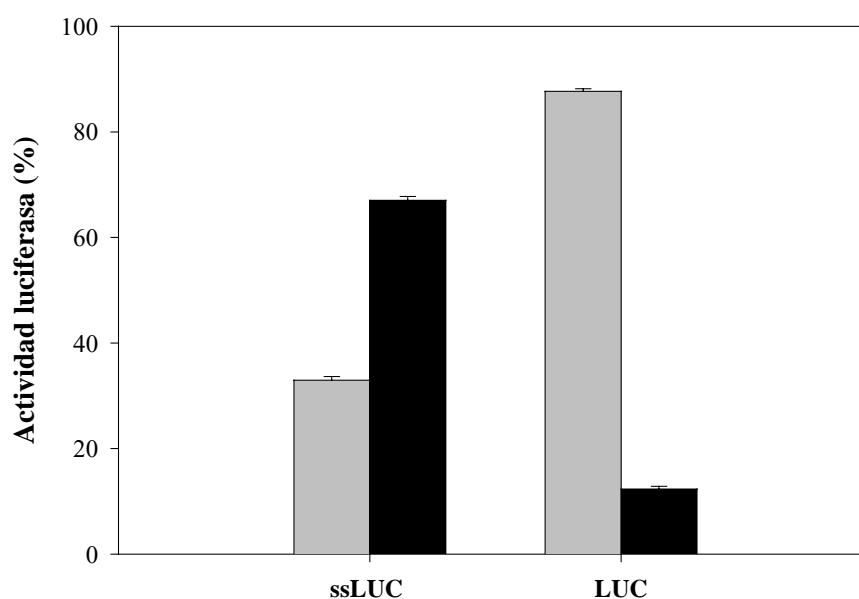


Fig 3.6.- Porcentaje de actividad luciferasa en las células (barras grises) y en el medio de cultivo (barra negras) respecto al total de actividad luciferasa medida en las células SBL transfectadas con pssNPY-luc+ (ssLUC) o con pCMVtk-luc+ (LUC). Cada barra representa la media de doce transfecciones independientes.

3.4.- DISCUSIÓN

Debido a los recientes avances en la secuenciación de los genomas de algunos peces, y a la construcción de librerías EST (*Expressed Sequence Tags*), el número de genes de peces identificados es cada vez mayor. Muchos de los trabajos relacionados con la expresión y funcionamiento de estos genes se han realizado en sistemas no homólogos. Sin embargo, para conocer las interacciones de unos genes con otros sería más apropiado utilizar sistemas de expresión conespecíficos. Las líneas celulares son modelos adecuados para la realización de estudios de regulación y función génica. En muchas especies acuáticas, como es el caso de la lubina, líneas celulares que se puedan utilizar en aplicaciones biotecnológicas no existen o no están bien caracterizadas. Con este trabajo, se ha pretendido evaluar la utilidad de la línea celular SBL como herramienta biológica para futuras aplicaciones en estudios de funcionalidad génica y de transgenesis en la lubina. Una de las características fundamentales de una línea que quiera ser utilizada con este propósito, debe ser su capacidad para ser transfectada. El mecanismo exacto por el que se produce la transfección no se conoce, y puede variar entre los diferentes tipos celulares y las distintas composiciones lipídicas de los reactivos (Wiethoff & Middaugh 2003; Romoren *et al.* 2004). Existen líneas celulares de peces donde la transfección es especialmente difícil, por eso, antes de iniciar un estudio para caracterizar la función de un gen concreto, es necesario evaluar la capacidad de estas líneas para incorporar DNA, y establecer las condiciones óptimas para una transfección eficiente. Se han determinado las mejores condiciones de uso para dos reactivos comerciales, FuGENE y Lipofectamine 2000, utilizados con éxito en líneas celulares de mamífero y de pez (Lopez *et al.* 2001; Alonso *et al.* 2003; Rocha *et al.* 2004). En el caso de la Lipofectamine 2000 se encontró que, cantidades mayores de reactivo llevaban a una mayor eficiencia en la transfección, medida ésta como un mayor porcentaje de células transfectadas y una mayor expresión del gen introducido. Sin embargo, el uso de dosis altas del reactivo resultaba tóxico para las células, y por consiguiente disminuía su viabilidad. Pese a las indicaciones del fabricante de utilizar células confluentes en un 90-95%, nuestros resultados demuestran que con una

confluencia menor (85%) se obtiene una transfección más eficiente. Además, hemos observado que el crecimiento de las células SBL durante el día siguiente a la transfección es menor, debido probablemente a la citotoxicidad del reactivo, recuperándose después de forma gradual. Este aspecto debe considerarse en experimentos donde se requiera medir el producto del gen 48 h después de la transfección, pues un exceso de células en el cultivo podrían llevar a una disminución global de los niveles de expresión. El reactivo FuGENE provocó menos toxicidad en las células. En cuanto a su eficiencia, parece que ésta no depende tanto de la cantidad de DNA o de reactivo, como de conseguir la combinación más óptima de ambos. Con las combinaciones 1.2 μ l de reactivo:0.2 μ g de DNA y 0.8 μ l de reactivo:0.4 μ g de DNA se conseguían las transfecciones más eficientes. En nuestro caso, una concentración celular baja (50% de confluencia) favorecía la eficiencia de la transfección. Concentraciones menores a ésta ya no son recomendables pues las células SBL no eran capaces de recuperar su tasa de crecimiento normal tras la transfección, y morían días después. Una densidad celular mayor a un 50% de confluencia disminuía la eficiencia de la transfección. Por otra parte, el número de células muertas tras transfectar con FuGENE era menor que con la Lipofectamine 2000. Por lo tanto, parece lógico que con el reactivo FuGENE se pueda transfectar a densidades celulares menores que con Lipofectamine, para conseguir una densidad de células por pocillo apropiada tras la transfección. Así, aunque los niveles de actividad luciferasa obtenidos con Lipofectamina 2000 eran ligeramente mayores, el reactivo FuGENE resulta más apropiado por no presentar problemas de toxicidad y muerte celular.

En el presente trabajo, se ha demostrado que en la línea celular SBL funcionan eficientemente diferentes promotores. El uso de promotores virales fuertes, como CMV, está muy extendido en los trabajos de laboratorio. Sin embargo, en muchas aplicaciones biotecnológicas sería deseable utilizar promotores no virales. Hasta el momento, no hay disponible ningún promotor propio de lubina, que nos permitiera comprobar su utilidad para dirigir la expresión de genes exógenos en células SBL. En este trabajo, se ha probado el promotor de la actina β de carpa, ya que es un promotor de origen piscícola, bien caracterizado y que ha permitido dirigir la expresión de genes

exógenos en otras líneas celulares de pez (Liu *et al.* 1990; Moav *et al.* 1993; Anderson *et al.* 1996). Con el promotor CMV se consiguieron niveles más altos de expresión en la línea celular SBL que con el promotor de la actina β de carpa. No obstante, para aquellas aplicaciones en la que se prefiera el uso de un promotor propio de pez, el promotor de la actina β de carpa permite, aunque a niveles más moderados, una expresión aceptable del transgen.

Como hemos comentado en capítulos anteriores, el sistema de regulación por tetraciclina se ha utilizado en diferentes líneas celulares de mamíferos y en la línea celular de pez EPC (ver 2.2). En este trabajo, se ha comprobado la capacidad de respuesta de la línea celular SBL al sistema de regulación por tetraciclina de una manera transitoria. Aunque la inducción conseguida en células SBL es menor que la conseguida en las EPC (tres veces frente a seis); este resultado nos permite pronosticar un buen funcionamiento de este sistema en aquellas aplicaciones que requieran establecer el sistema de regulación por tetraciclina en la línea SBL, ya que su introducción de manera estable ayudaría a mejorar los niveles de inducción.

Otra característica deseable en una línea celular es que sea capaz de secretar el producto del gen introducido, siempre que éste posean las señales necesarias para ello. Muchas de las proteínas recombinantes de pez existentes se han utilizado como ligandos en estudios de interacción ligando-receptor, y se han producido en sistemas heterólogos de expresión (Duval *et al.* 2002; Vischer *et al.* 2003). El hecho de que las células SBL sean capaces de secretar eficientemente los productos de los genes transferidos, permitirá la obtención de proteínas recombinantes de lubina sintetizadas en un contexto homólogo a lo que ocurre *in vivo* en el organismo.

La conclusión del conjunto de experimentos llevados a cabo es, que la línea celular SBL puede servir como modelo para distintas aplicaciones, ya sean estudios de la función génica en animales marinos, obtención de peces transgénicos o la producción de proteínas recombinantes con interés industrial o experimental de origen marino.

Bibliografía

- Alam MS, Lavender FL, Iyengar A, Rahman MA, Ayad HH, Lathe R, Morley SD & Maclean N 1996 Comparison of the activity of carp and rat beta-actin gene regulatory sequences in tilapia and rainbow trout embryos. *Mol.Reprod.Dev.* **45** 117-122.
- Alonso M, Johnson M, Simon B & Leong JA 2003 A fish specific expression vector containing the interferon regulatory factor 1A (IRF1A) promoter for genetic immunization of fish. *Vaccine* **21** 1591-1600.
- Altschmied J & Duschl J 1997 Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors. *Biotechniques* **23** 436-438.
- Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J & Leong JA 1996 Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **5** 105-113.
- Baron U, Freundlieb S, Gossen M & Bujard H 1995 Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* **23** 3605-3606.
- Cerda-Reverter JM, Martinez-Rodriguez G, Zanuy S, Carrillo M & Larhammar D 2000 Molecular evolution of the neuropeptide Y (NPY) family of peptides: cloning of three NPY-related peptides from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Regul.Pept.* **95** 25-34.
- Chen C & Okayama H 1987 High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol.Cell Biol.* **7** 2745-2752.
- Chen CA & Okayama H 1988 Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* **6** 632-638.
- Delsert C, Morin N & Comps M 1997 Fish nodavirus lytic cycle and semipermissive expression in mammalian and fish cell cultures. *Journal of Virology* **71** 5673-5677.
- Duval H, Rousseau K, Elies G, Le Bail PY, Dufour S, Boeuf G & Boujard D 2002 Cloning, characterization, and comparative activity of turbot IGF-I and IGF-II. *Gen.Comp Endocrinol.* **126** 269-278.
- Hanahan D 1983 Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166** 557-580.
- Keller GA, Gould S, Deluca M & Subramani S 1987 Firefly Luciferase Is Targeted to Peroxisomes in Mammalian-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84** 3264-3268.
- Liu ZJ, Moav B, Faras AJ, Guise KS, Kapuscinski AR & Hackett PB 1990 Functional analysis of elements affecting expression of the beta-actin gene of carp. *Mol.Cell Biol.* **10** 3432-3440.
- Lopez A, Fernandez-Alonso M, Rocha A, Estepa A & Coll JM 2001 Transfection of epithelioma papulosum cyprini (EPC) carp cells. *Biotechnology Letters* **23** 481-487.
- Moav B, Liu Z, Caldovic LD, Gross ML, Faras AJ & Hackett PB 1993 Regulation of expression of transgenes in developing fish. *Transgenic Res.* **2** 153-161.

-
- Rocha A, Ruiz S & Coll JM 2004 Improvement of Transfection Efficiency of Epithelioma Papulosum Cyprini Carp Cells by Modification of Cell Cycle and Use of an Optimal Promoter. *Mar.Biotechnol.(NY)*.
- Romoren K, Thu BJ, Bols NC & Evensen O 2004 Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin. *Biochim.Biophys.Acta* **1663** 127-134.
- Sherf BA & Wood KV 1994 Firefly luciferase engineered for improved genetic reporting. *Promega Notes* **49** 15-21.
- Snedekor GW & Cochran WG 1980 *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames, IA.
- Sokal RR & Rohlf FJ 1981 *Biometry*. Freeman and Company, London.
- Vischer HF, Granneman JC, Linskens MH, Schulz RW & Bogerd J 2003 Both recombinant African catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor. *J.Mol.Endocrinol.* **31** 133-140.
- Wiethoff CM & Middaugh CR 2003 Barriers to nonviral gene delivery. *J.Pharm.Sci* **92** 203-217.
- Wise JP, Winn RN & Renfro JL 2002 Generating new marine cell lines and transgenic species--conference summary. *J.Exp.Zool.* **292** 217-220.

**DISCUSIÓN GENERAL
Y
CONCLUSIONES**

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Este trabajo abarca distintos aspectos de la metodología de la transferencia génica en lubina, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por una parte, se ha centrado en el estudio y evaluación de la transferencia génica somática como posible sustitución a la transgénesis estable en distintas aplicaciones. Por otra parte, se ha evaluado el sistema de regulación por tetraciclina para la regulación exógena de genes en peces. Por último, se ha probado que una línea celular de lubina puede utilizarse como sistema de expresión de genes exógenos.

Por primera vez se demuestra que la inyección de DNA plasmídico es eficiente para transferir genes exógenos a músculo de lubina. Los factores que favorecen la expresión son, dosis altas de plásmido (entre 75 y 100 µg), el uso de un promotor adecuado, y un estado metabólicamente activo del músculo, lo que se ve favorecido por el mantenimiento de los peces a una temperatura templada. La expresión que se obtiene es transitoria, alcanzándose el máximo cinco días después de la inyección. Cabe destacar, que algunas estrategias utilizadas en mamíferos para mejorar la toma de DNA por parte de las células musculares, como el uso de bupivacaína (Ajiki *et al.* 2003; Tokui *et al.* 1997) o polímeros (Mumper *et al.* 1996), no han funcionado en lubina. Esto sugiere la existencia de diferencias entre la biología del músculo en mamíferos y en peces; muy probablemente en su proceso de regeneración y en el comportamiento de las membranas celulares (Bell *et al.* 1986; Romoren *et al.* 2004). Una limitación de la técnica de transferencia somática es la incapacidad de reproducir, en los distintos individuos inyectados, la manera exacta en que la aguja de inyección entra en el paquete muscular, lo que origina una gran variabilidad en cuanto a la toma de DNA por parte de las células, y por tanto en el nivel de expresión del transgen. Esto se puede mejorar aumentando el número de animales inyectados, para disminuir así el error debido a la técnica, o usando una segunda construcción para normalizar la transfección.

La técnica de inyección de DNA en músculo se ha ensayado como método de vacunación en peces (Anderson *et al.* 1996; Corbeil *et al.* 2000; Heppell & Davis 2000). Sin embargo, ésta es la primera vez, que se ensaya esta técnica en peces para

secretar una hormona en sangre. Como gen a inyectar, se ha diseñado y construido un gen híbrido que codifica una hormona gonadotropa de cadena única de lubina. Tras su inyección en músculo de lubina se pudo detectar la proteína en plasma. Aunque este método todavía es susceptible de mejora, con este trabajo hemos demostrado que esta estrategia puede ser útil para realizar estudios sobre la función de hormonas u otras proteínas que se distribuyan por el torrente sanguíneo, además de sentar las bases metodológicas para el diseño de diferentes aplicaciones biotecnológicas que requieran modificaciones en la fisiología del individuo.

En cualquier sistema biológico que se utilice como huésped para estudios de función génica, es importante disponer de un método que permita controlar la expresión de genes exógenos de manera fiable. Para sistemas de origen piscícola, tanto líneas celulares cultivadas *in vitro* como peces transgénicos, no se dispone hasta el momento de una técnica eficaz para este control. Por primera vez, hemos probado la utilidad del sistema de regulación por tetraciclina para esta misión. Tras valorar diferentes versiones del sistema en células de pez *in vitro* y en músculo *in vivo*, podemos concluir que la opción más eficiente es el uso del transactivador tTA bajo el control de un promotor estable.

Al igual que en células de mamíferos (Gopalkrishnan *et al.* 1999; Gossen & Bujard 1992; Howe *et al.* 1995), hemos comprobado que las células de pez también presentan dificultades para mantener el sistema de regulación por tetraciclina de una manera funcional; como resultado, encontrar clones con un grado de regulación óptimo y un nivel bajo de expresión basal es difícil. Estos constituyen un porcentaje muy pequeño de los clones obtenidos, y quedan muchas veces enmascarados por el crecimiento más rápido de clones que han silenciado el sistema. Sin embargo, la utilización de una estrategia basada en el uso del plásmido nuevo pTet-luc+-pur/GFP facilita esta tarea, y permite obtener un porcentaje de clones regulables mucho mayor que en otros trabajos. El número de clones obtenidos con el sistema *tet-on* en células EPC fue muy pequeño comparado con los obtenidos con el sistema *tet-off*, esto no sucede en células de mamífero (HEK 293) donde el número de clones obtenidos fue

aproximadamente el mismo para los dos sistemas, lo que indica que las células de pez (EPC) no toleran bien el sistema *tet-on*.

A lo largo de este trabajo se han comparado los promotores CMV, de origen viral, y el promotor de la actina β de carpa, para dirigir la expresión de distintos genes, tanto en las líneas celulares EPC y SBL, como en músculo de lubina *in vivo*. El conjunto de los resultados nos permite concluir que el promotor de actina β de carpa, al menos en lo que respecta al fragmento que nosotros hemos utilizado consistente en 4.6 kb del gen (Liu *et al.* 1990; Rahman & Maclean 1992), es más débil que el promotor CMV en cuanto al nivel de expresión génica que logra promover, y menos estable a la hora de mantenerse en una línea celular. Para evitar el uso de promotores virales, sería necesario el aislamiento y posterior evaluación de otros promotores de peces.

Por último, los resultados obtenidos con la línea celular SBL permiten señalar a esta línea como un sistema de lubina apto para la expresión de genes exógenos y la realización de estudios de función génica. Se ha demostrado que estas células son capaces de secretar los productos de los genes introducidos, con lo que podrían ser utilizadas para la producción de proteínas recombinantes. Se recomienda el reactivo FuGENE frente a la Lipofectamine 2000 para su transfección, ya que presentando una eficiencia similar, éste último resulta más tóxico provocando una muerte celular mayor.

En resumen, con este trabajo se han desarrollado soluciones prácticas a problemas que se habían planteado en relación con la transferencia génica en peces, como es la disponibilidad de un sistema eficiente y seguro para el control exógeno de la expresión de los transgenes. Por otra parte, se han llevado a cabo por primera vez experimentos de transferencia génica utilizando como sistema biológico a la lubina, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que ha sentado las bases para el establecimiento de la transferencia génica en esta especie y su potencial aplicación tanto para la mejora como para la solución de problemas de cultivo.

Bibliografía

- Ajiki T, Murakami T, Kobayashi Y, Hakamata Y, Wang J, Inoue S, Ohtsuki M, Nakagawa H, Kariya Y, Hoshino Y & Kobayashi E 2003 Long-lasting gene expression by particle-mediated intramuscular transfection modified with bupivacaine: combinatorial gene therapy with IL-12 and IL-18 cDNA against rat sarcoma at a distant site. *Cancer Gene Ther.* **10** 318-329.
- Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J & Leong JAC 1996 Genetic immunization of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **5** 114-122.
- Bell MV, Henderson RJ & Sargent JR 1986 The Role of Polyunsaturated Fatty-Acids in Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **83** 711-719.
- Corbeil S, Kurath G & LaPatra SE 2000 Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. *Fish & Shellfish Immunology* **10** 711-723.
- Gopalkrishnan RV, Christiansen KA, Goldstein NI, DePinho RA & Fisher PB 1999 Use of the human EF-1alpha promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **27** 4775-4782.
- Gossen M & Bujard H 1992 Tight Control of Gene-Expression in Mammalian-Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** 5547-5551.
- Heppell J & Davis HL 2000 Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced Drug Delivery Reviews* **43** 29-43.
- Howe JR, Skryabin BV, Belcher SM, Zerillo CA & Schmauss C 1995 The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J.Biol.Chem.* **270** 14168-14174.
- Liu ZJ, Moav B, Faras AJ, Guise KS, Kapuscinski AR & Hackett PB 1990 Functional analysis of elements affecting expression of the beta-actin gene of carp. *Mol.Cell Biol.* **10** 3432-3440.
- Mumper RJ, Duguid JG, Anwer K, Barron MK, Nitta H & Rolland AP 1996 Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm.Res.* **13** 701-709.
- Rahman A & Maclean N 1992 Fish transgene expression by direct injection into fish muscle. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **1** 286-289.
- Romoren K, Thu BJ, Bols NC & Evensen O 2004 Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin. *Biochim.Biophys.Acta* **1663** 127-134.
- Tokui M, Takei I, Tashiro F, Shimada A, Kasuga A, Ishii M, Ishii T, Takatsu K, Saruta T & Miyazaki J 1997 Intramuscular injection of expression plasmid DNA is an effective means of long-term systemic delivery of interleukin-5. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **233** 527-531.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES GENERALES

Del análisis de los resultados presentados en este trabajo cabe destacar las siguientes conclusiones:

1. La inyección de genes, contenidos en un plásmido, en músculo de lubina es un método eficiente para conseguir su expresión transitoria en este tejido.
2. La eficiencia de la inyección de genes en músculo de lubina está influenciada por distintos factores como son, la cantidad de DNA plasmídico inyectado, el promotor utilizado para dirigir la expresión, y el estado metabólico del músculo.
3. Sistemas eficientes en músculo de mamífero para incrementar la toma de DNA por parte de las células no funcionan en el músculo de pez. De lo que se deduce que las técnicas que han funcionado en mamíferos deben evaluarse antes de su aplicación en peces.
4. La inyección en músculo de lubina de un gen que codifique una proteína secretable es útil como método para la liberación transitoria de proteínas al torrente sanguíneo.
5. El desarrollo de un plásmido que responde a tetraciclina, conteniendo un gen que codifica una proteína de fusión entre la resistencia a puromicina, y la proteína verde fluorescente, permite, tanto en células de mamífero como de peces, aislar eficientemente clones con un nivel bajo de expresión basal, un grado de regulación óptimo, y una gran estabilidad del sistema de regulación por tetraciclina.

6. El sistema de regulación por tetraciclina es eficiente para la regulación de genes exógenos en células de pez *in vitro* e *in vivo*.
7. En la aplicación del sistema de regulación por tetraciclina en peces, el transactivador tTA es más eficiente que el transactivador rtTA, tanto por su mayor estabilidad, como por el grado superior de inducción alcanzado.
8. El promotor viral CMV genera un mayor nivel de expresión que el promotor de actina β de carpa en células de lubina, tanto *in vitro* como *in vivo*. También promueve una expresión más estable de los transactivadores del sistema de regulación por tetraciclina en células de pez.
9. La utilización de un plásmido autorregulado con el transactivador rtTA, resulta eficiente para la regulación transitoria de genes exógenos en células de pez. Sin embargo, su uso no es recomendable para obtener clones estables ni de forma transitoria *in vivo*.
10. La línea celular de lubina SBL es útil como sistema de expresión de genes exógenos.
11. A partir de este trabajo, ya se puede disponer de un sistema *in vitro* homólogo para estudios funcionales de genes de lubina.
12. Este trabajo constituye un primer paso para el establecimiento de la transferencia génica en lubina, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por otra parte, se demuestra por primera vez, que el sistema de regulación por tetraciclina es eficiente para la regulación exógena de genes en peces.